

VALQUÍRIA BARBOSA NANTES FERREIRA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE DA *Equisetum arvense* E DA *Marsypianthes chamaedrys***

FLORIANÓPOLIS - SC

2001

VALQUÍRIA BARBOSA NANTES FERREIRA

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA
Equisetum arvense **E DA** *Marsypianthes chamaedrys*

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre, pelo curso de
Pós-Graduação em Química – Área de Química
Orgânica, do Centro de Ciências Físicas e
Matemática da Universidade Federal de Santa
Catarina.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rozangela Curi
Pedrosa**

**Co-orientadores: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho
Prof. Dr. Rosendo A. Yunes**

FLORIANÓPOLIS – SC

2001

TERMO DE APROVAÇÃO

VALQUÍRIA BARBOSA NANTES FERREIRA

ESTUDO QUÍMICO E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA

Equisetum arvense E DA *Marsypianthes chamaedrys*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela comissão formada pelos professores:

Prof.^a. Dr.^a. Rozangela Curi Pedrosa (Orientadora)
Departamento de Bioquímica da UFSC

Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes (Co-orientador)
Departamento de Química da UFSC

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho (Co-orientador)
Departamento de Farmácia da UNIVALI

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho
Departamento de Ecologia e Zoologia da UFSC

Prof.^a Dr.^a Vera Lucia A. Frescura Bascuñan
Departamento de Química da UFSC

17 de dezembro de 2001

Dedico este trabalho aos meus pais Valdir e Maria Helena e aos meus amigos, tanto os anteriores como os que fiz durante a realização desta pesquisa. Sem os quais, o trabalho se tornaria mais árido e menos proveitoso.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus, causa primeira de todas as coisas;

À Prof.^a Dr.^a Rozangela Curi Pedrosa e todos seus orientandos, por sua orientação e apoio oferecidos durante a realização deste trabalho;

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, pela sua orientação química e incentivo, e ao Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes pelo apoio concedido durante a execução desta pesquisa;

Ao Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho e suas orientandas, por toda sua presteza e colaboração durante a realização dos ensaios bioquímicos;

Ao Prof. Dr. Franco Delle Monache, CNR-Instituto di Chimica-UCSC, Roma-Itália, pela obtenção dos espectros e auxílio na identificação estrutural dos compostos;

Ao Laboratório Vida e Saúde pelo fornecimento do material vegetal da *Equisetum arvense*;

Ao Prof. Dr. Sérgio Ferreira pelo fornecimento do material vegetal da *Marsypianthes chamaedrys*;

Às queridas amigas Irma Luiza Christmann e Louisiane Bresciani por todo seu apoio, dedicação, companheirismo e incentivo inegáveis nos experimentos químicos e bioquímicos, bem como em todos os momentos desta pesquisa;

À colega Angela por sua orientação, apoio e colaboração irrestritas nas análises químicas e elucidações estruturais dos compostos;

A todos os companheiros de laboratório (Tiago, Paula, Cristiane, Jacks, Paulo, Ana Bia, Guedes, Rosi, Dione, Julieta, Daniele e os novatos Graziela e Rodrigo), pelo excelente ambiente de trabalho, por todo apoio e colaboração espontânea e imediata;

Às amigas Alessandra, Milena, Liane e Luciene, por sua amizade e incentivo;

À CAPES pelo apoio financeiro;

Ao curso de Pós-graduação em Química;

À Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, confiança e paciência que me fizeram persistir na realização deste sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. PRODUTOS NATURAIS E PLANTAS MEDICINAIS	1
1.2. RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)	5
1.2.1. Defesas Antioxidantes	11
1.2.2. Proteções Antioxidantes Enzimáticas.....	11
2 OBJETIVOS	15
2.1. GERAIS	15
2.2. ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. <i>Equisetum arvense</i> L.	16
3.1.1. Características Taxonômicas	16
3.1.2. Estudos Químicos e Farmacológicos.....	17
3.2. <i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Vahl) Kuntze	21
3.2.1. Características Taxonômicas	21
3.2.2. Estudos Químicos e Farmacológicos.....	22
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	25
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1.1. Introdução.....	25
4.1.2. Partição (Extração Líquido-Líquido).....	25
4.1.3. Métodos Cromatográficos	26
4.1.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	26
4.1.3.2. Cromatografia Líquida em Coluna (CC)	27
4.1.3.2.1. Cromatografia Líquido-Sólido	27
4.1.3.2.2. Cromatografia por Permeação de Gel (ou de Exclusão).....	28
4.2. MATERIAL VEGETAL	28
4.2.1. <i>Equisetum arvense</i> L.	28
4.2.2. <i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Vahl) Kuntze	28
4.3. ANIMAIS.....	29
4.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	29
4.4.1. <i>Equisetum arvense</i>	29
4.4.1.1. Extração.....	29
4.4.1.2. Fracionamento de Extrato Bruto Metanólico.....	29
4.4.1.3. Fracionamento da Fração DCM	30
4.4.1.4. Fracionamento da Fração MeOH.....	31
4.4.2. <i>Marsypianthes chamaedrys</i>	31
4.4.2.1. Extração.....	31
4.4.2.2. Fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico.....	32
4.4.2.3. Fracionamento da Fração AE	32
4.4.2.4. Fracionamento da Fração BuOH	32
4.5. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE.....	33
4.5.1. Teste de Toxicidade Sobre <i>Artemia salina</i>	33
4.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE “IN VIVO”	33
4.6.1. Preparação das Amostras.....	34
4.6.1.1. Homogenato	34
4.6.1.2. Extrato Ácido	34
4.6.2. Atividade dos Marcadores de Estresse Oxidativo e das Defesas Antioxidantes.....	34
4.6.2.1. Avaliação da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS).....	34
4.6.2.2. Defesas Antioxidantes Enzimáticas.....	35

4.6.2.2.1. Glutathione S-Transferase (GST).....	35
4.6.2.2.2. Catalase (CAT).....	35
4.6.2.2.3. Superóxido Dismutase (SOD)	36
4.6.2.2.4. Glutathione Peroxidase (GPx).....	36
4.6.2.3. Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas	37
4.6.2.3.1. Glutathione Reduzida (GSH).....	37
4.6.2.3.2. Glutathione Total (GT) E Glutathione Oxidada (GSSG)	37
4.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE “IN VITRO” DA <i>Equisetum arvense</i>	38
4.7.1. Formação e Monitoramento de Radicais Hidroxila.....	38
4.7.2. Formação e Monitoramento dos Radicais Ânion Superóxido	38
4.7.3. Análise Estatística	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1. RESULTADOS BIOLÓGICOS	40
5.1.1. Avaliação da Citotoxicidade.....	40
5.2. RESULTADOS BIOQUÍMICOS.....	41
5.2.1. Análise do Potencial Antioxidante “in vivo”.....	41
5.2.2. Análise do Potencial Antioxidante “in vitro” do Extrato Bruto da <i>E. arvense</i>	51
5.3. RESULTADOS FITOQUÍMICOS.....	52
5.3.1. <i>Equisetum arvense</i>	52
5.3.1.1. Fração DCM	54
5.3.1.2. Fração MeOH.....	54
5.3.2. <i>Marsypianthes chamaedrys</i>	54
5.3.2.1. Fração AE.....	56
5.3.2.1.1 Fração 32-43.....	56
5.3.2.1.2. Fração 54-68.....	56
5.3.2.2. Fração BuOH.....	61
5.3.2.2.1. Fração 6-13.....	61
5.3.2.2.2. Fração 30-38.....	62
6 CONCLUSÕES	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ELUENTES E REVELADORES UTILIZADOS PARA O MONITORAMENTO DAS FRAÇÕES DA <i>E. arvense</i>	30
TABELA 2 – EFEITO DAS FRAÇÕES E EXTRATO BRUTO DA <i>E. arvense</i> E DA <i>M.</i> <i>chamaedrys</i> SOBRE <i>Artemia salina</i>	41
TABELA 3 – RESULTADOS DO MONITORAMENTO DOS RADICAIS HIDROXILA ($\cdot\text{OH}$) NO EXTRATO BRUTO DA <i>E. arvense</i>	51
TABELA 4 – PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DO NTB PELO EXTRATO BRUTO DA <i>E.</i> <i>arvense</i>	52
TABELA 5 – DADOS DE RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DA LITERATURA, DO BUTIL ROSMARINATO (Fr. BuOH 6-13) E DO ÁCIDO ROSMARÍNICO (Fr. BuOH 30-38) ISOLADOS DA <i>M. chamaedrys</i>	63
TABELA 6 – DADOS DE RMN ^{13}C (300 MHz, CD_3OD) DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DA LITERATURA, DO BUTIL ROSMARINATO (Fr. BuOH 6-13) E DO ÁCIDO ROSMARÍNICO (Fr. BuOH 30-38) ISOLADOS DA <i>M. chamaedrys</i>	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CONFIGURAÇÃO DO ORBITAL MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE OXIGÊNIO	6
FIGURA 2 – ESQUEMA DE AÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES	14
FIGURA 3 – ALGUNS COMPOSTOS JÁ ISOLADOS DA <i>E. arvense</i>	19
FIGURA 4 – <i>Equisetum arvense</i> L.....	20
FIGURA 5 - ALGUNS COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>M. chamaedrys</i>	23
FIGURA 6 – <i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Vahl) Kuntze	24
FIGURA 7 – CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM RATOS CONTROLES TRATADOS COM DEPRENIL, COM O EXTRATO BRUTO DA <i>E. arvense</i> (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BUOH DA <i>M. chamaedrys</i> (b).....	43
FIGURA 8 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM RATOS CONTROLES TRATADOS COM DEPRENIL, COM O EXTRATO BRUTO DA <i>E. arvense</i> (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BUOH DA <i>M. chamaedrys</i> (b).....	44
FIGURA 9 – ATIVIDADE DA CAT EM RATOS CONTROLES TRATADOS COM DEPRENIL, COM O EXTRATO BRUTO DA <i>E. arvense</i> (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BUOH DA <i>M. chamaedrys</i> (b).....	45
FIGURA 10 – ATIVIDADE DA GPx EM RATOS CONTROLES TRATADOS COM DEPRENIL, COM O EXTRATO BRUTO DA <i>E. arvense</i> (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BUOH DA <i>M. chamaedrys</i> (b).....	46
FIGURA 11 – ATIVIDADE DA GR EM RATOS CONTROLES TRATADOS COM DEPRENIL, COM O EXTRATO BRUTO DA <i>E. arvense</i> (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BUOH DA <i>M. chamaedrys</i> (b).....	47
FIGURA 12 – ATIVIDADE DA GST EM RATOS CONTROLES TRATADOS COM DEPRENIL, COM O EXTRATO BRUTO DA <i>E. arvense</i> (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BUOH DA <i>M. chamaedrys</i> (b).....	48
FIGURA 13 – CONCENTRAÇÃO GT EM RATOS CONTROLES TRATADOS COM DEPRENIL, COM O EXTRATO BRUTO DA <i>E. arvense</i> (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BUOH DA <i>M. chamaedrys</i> (b).....	49
FIGURA 14 – ATIVIDADE DA SOD EM RATOS CONTROLES TRATADOS COM DEPRENIL, COM O EXTRATO BRUTO DA <i>E. arvense</i> (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BUOH DA <i>M. chamaedrys</i> (b).....	50
FIGURA 15 – ESQUEMA DE ANÁLISE FITOQUÍMICA DA <i>E. arvense</i>	53
FIGURA 16 – ESQUEMA DE ANÁLISE FITOQUÍMICA DA <i>M. chamaedrys</i>	55
FIGURA 17 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ALDEÍDO PROTOCATÉQUICO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	56
FIGURA 18 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO PROTOCATÉQUICO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	57
FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN ¹ H (300 MHz, ACETONA) DO ALDEÍDO PROTOCATÉQUICO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	58
FIGURA 20 – ESPECTRO DE IV (PASTILHA DE KBr) DO ÁCIDO PROTOCATÉQUICO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	59
FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN ¹ H (300 MHz, ACETONA) DO ÁCIDO PROTOCATÉQUICO ISOLADO DA <i>Sebastiania schottiana</i>	60
FIGURA 22 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO BUTIL ROSMARINATO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	61
FIGURA 23 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	63
FIGURA 24 – ESPECTRO DE IV (PASTILHA DE KBr) DO BUTIL ROSMARINATO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	65

FIGURA 25 – ESPECTRO DE RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) DO BUTIL ROSMARINATO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	66
FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) DO BUTIL ROSMARINATO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	67
FIGURA 27 – ESPECTRO DE IV (PASTILHA DE KBr) DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	68
FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DA <i>M. chamaedrys</i>	69
FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DA <i>M. chamadrys</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ACET	– Acetona
AE	– Acetato de Etila
CAT	– Catalase
CC	– Cromatografia em Coluna
CCD	– Cromatografia em Camada Delgada
CDNB	– 1-Cloro-2, 4 Dinitrobenzeno
d	– Dublete
dd	– Duplo Dublete
DCM	– Diclorometano
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DPTA	– Dietilenotriaminopentacético
ERO	– Espécies Reativas do Oxigênio
GPX	– Glutational Peroxidase
GR	– Glutational Redutase
GSH	– Glutational Reduzida
GST	– Glutational S-Transferase
GT	– Glutational Total
HEX	– Hexano
IC ₅₀	– Concentração Inibitória a 50 %
LC ₅₀	– Concentração Letal a 50 %
m	– Multiplete
NTA	– Nitrilotriacético
NBT	– Nitrobluetetrazolium
s	– Singlete
SOD	– Superóxido Dismutase
t	– Triplete
TAS	– Teste de Toxicidade Sobre Artemia Salina
TBA	– Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	– Espécies Reativas com o Ácido Tiobarbitúrico
TCA	– Ácido Tricloroacético

RESUMO

O uso de produtos naturais é tão antigo quanto algumas civilizações humanas. Com o passar do tempo e observando a natureza, o homem começou a perceber as propriedades curativas das plantas. Estas propriedades foram difundidas de geração para geração, surgindo assim a chamada “medicina popular”. As plantas *Equisetum arvense* e *Marsypianthes chamaedrys* foram escolhidas para este trabalho por serem utilizadas pela população contra diversos tipos de patologias.

A *Equisetum arvense*, planta que pertence à família Equisetaceae é popularmente conhecida como cavalinha, sendo muito utilizada na medicina popular para o tratamento da tuberculose, retenção de urina, problemas da próstata e como diurético, entre outros.

A *Marsypianthes chamaedrys*, pertencente à família Lamiaceae, conhecida popularmente como paracará, bóia-caá e corta-hérpes, é usada na medicina “caseira” para combater o veneno de cobra.

Para o isolamento e identificação dos compostos destas plantas utilizou-se os métodos cromatográficos (CC e CCD) e espectroscópicos usuais (IV, RMN ^1H e ^{13}C). Da *E. arvense* foram isolados os esteróis β -sitosterol e stigmasterol. Da fração AE (acetato de etila) da *M. chamaedrys* foram identificados o ácido protocatéquico e seu derivado aldeído protocatéquico, e da fração BuOH (butanólica), o ácido rosmarínico e seu derivado butil rosmarinato. Foram feitos os testes do potencial antioxidante “in vivo”, pela análise da atividade dos marcadores de estresse oxidativo (TBARS, GSH, CAT, GPx, GR, GT, GST E SOD), em tecido cerebral de ratos machos tratados com o controle, deprenil, com o extrato bruto das duas plantas, e as frações AE e BuOH da *M. chamaedrys*. Tanto a cavalinha como a corta-hérpes exerceram um efeito protetor sobre o dano tecidual, verificado pelos baixos níveis de TBARS. Os níveis de algumas defesas antioxidantes permaneceram inalterados (CAT e SOD), que podem sugerir que

foram pouco requisitadas pelo sistema de defesa antioxidante. Para a *E. arvense* foram também realizados testes para avaliação do potencial antioxidante “in vitro”, pelo método de formação e monitoramento dos radicais hidroxila e ânion superóxido. O extrato bruto desta planta apresentou uma forte inibição na formação de ambos os radicais, com $IC_{50} = 7,0$ para o radical hidroxila e $IC_{50} = 1,0$ para o ânion superóxido.

Com base nestes resultados, pode-se concluir que alguns dos compostos presentes nestas plantas podem ser responsáveis por seu efeito antioxidante, seja atuando como “seqüestrador” de radicais livres ou mesmo estimulando a “síntese de novo” das defesas antioxidantes.

ABSTRACT

The use of natural products is as ancient as some human civilizations. Observing the nature, the mankind began to note the many properties of plants, thus originating the popular medicine. *Equisetum arvense* L. and *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze were selected for the present work because their common use related to different health problems.

Equisetum arvense L. (Equisetaceae) is known as horsetail, being used by the rural population to treat several problems, including tuberculosis, urine retention, and prostate disorders among others.

Marsypianthes chamaedrys (Vahl) Kuntze (Lamiaceae) is known as “paracari”, “bóia-caá” and “corta-hérpes”, and is used in popular medicine to combat snake venoms.

For the isolation and identification of some compounds from these plants conventional chromatographic (CC, CCD) and spectroscopic (IR, NMR ^1H and ^{13}C) methods were used. From *E. arvense* was isolated a mixture of sterols (β -sitosterol and stigmasterol). From the AE fraction of *M. chamaedrys* was identified the protocatechuic acid and the protocatechualdehyde while the BuOH fraction furnished the rosmarinic acid and butyl rosmarinate. Some tests about the antioxidant potential “in vivo” were also performed through the analysis of the activity of oxidative stress indicators (TBARS, GSH, CAT, GPx, GR, GT, GST and SOD) in mice brain treated with Deprenil and with both plant extracts, and also with AE and BuOH fractions from *M. chamaedrys*. Both plants showed a protective effect observed through the low levels of TBARS. GSH levels and GPx activity were enhanced and the other antioxidants did not show significant differences when compared to controls. Some tests in *E. arvense* were also performed in order to analyse the “in vitro” antioxidant

potential regarding the generation formation of hidroxyyl and superoxide radicals. The extracts from these plants showed a strong inhibitory effect in the generation of both radicals, with $IC_{50} = 7,00$ to hidroxyyl radical and $IC_{50} = 1,0$ to superoxide anion.

These results permit us to conclude that some compounds present in these plants have antioxidant properties probably acting as scavenger of oxygen free radicals.

1. INTRODUÇÃO

1.1.PRODUTOS NATURAIS E PLANTAS MEDICINAIS

O uso de produtos naturais é tão antigo quanto algumas civilizações humanas. Durante um longo período, o homem serviu-se da natureza para sua subsistência, utilizando produtos minerais, animais e plantas para construção de casas, confecções de ferramentas, roupas, utensílios domésticos, entre outros (Ugaz, 1994; Rates, 2001). Com o passar do tempo, observando a natureza, o homem começou a perceber as propriedades curativas das plantas. Estas propriedades foram difundidas de geração em geração, surgindo assim a chamada “medicina popular” (Huxley, 1967).

De acordo com a Organização Panamericana de Saúde (OPS), *plantas medicinais* são aquelas usadas com função de ajudar, prevenir ou curar enfermidades, ou alterar processos psico-patológicos, sendo também denominadas plantas utilizadas como fontes para fármacos ou derivados deles. Um *fitoterápico* é um medicamento obtido exclusivamente de plantas (partes aéreas, raízes, extratos, resinas e óleos), no estado bruto, ou como formulações farmacêuticas. Um *medicamento* é um produto preparado de acordo com procedimentos técnicos e legais, usado para prevenção e tratamento de doenças. *Fármaco* é um composto ativo que faz parte da composição de um medicamento, independente de sua origem: natural, biotecnológica ou sintética (Rates, 2001).

Existem documentos de grandes civilizações antigas, como a chinesa, a indiana e a norte-africanas, que citam o uso de plantas para o tratamento de uma grande variedade de doenças. Há indícios de que na Grécia antiga estas plantas eram até mesmo classificadas e catalogadas (Phillipson, 2001; Hamburger e Hosttettmann, 1991).

Theophrastus, que é considerado o pai da botânica, evidenciava e divulgava as virtudes das plantas medicinais. Quando a Europa, durante a Idade Média, entrou na chamada “era negra”, muitas das informações sobre plantas medicinais poderiam ter se

perdido, não fossem os monastérios, que eram considerados na época como grandes centros de cultivo de plantas para o uso contra os males que assolavam a humanidade. Mas somente no início do século 19 conseguiu-se isolar as substâncias ativas de plantas consideradas medicinais: o isolamento da quinina das cascas da *Cinchona* pelos cientistas franceses Caventou e Pelletier, foi considerado um marco no avanço do estudo de plantas (Phillipson, 2001).

Antes da Segunda Guerra Mundial, uma série de produtos naturais isolados de plantas tornaram-se agentes clínicos, e alguns deles continuam sendo usados até hoje: quinina das cascas da *Cinchona*, morfina e codeína do látex da papoula, digoxina das folhas da *Digitalis*, atropina e hioscina das espécies da família Solanaceae. A era dos antibióticos floresceu durante e depois da Segunda Guerra Mundial devido aos efeitos antibacterianos de uma série de produtos naturais isolados das espécies de *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Streptomyces*. Nos anos pós-guerra ocorreram poucas descobertas de novos fármacos originários de plantas, com exceção da reserpina das espécies de *Rauwolfia*, prenunciando a era dos tranqüilizantes, a vimblastina e a vincristina da *Catharanthus roseus*, que são eficazes contra alguns tipos de câncer (Phillipson, 2001).

Com a Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica, cresceu o interesse por produtos sintéticos para o tratamento farmacológico. As causas deste interesse relacionavam-se ao fato de que compostos puros eram mais fáceis de serem obtidos, de que as modificações estruturais ocasionavam um maior aumento da atividade, e devido à facilidade de fármacos mais seguros serem produzidos. Por outro lado, na cultura de alguns povos, as plantas medicinais tinham um significado mágico-religioso que ia contra o modo de vida industrializado das sociedades ocidentais, as quais consideravam que os fármacos derivados de plantas somente uma superstição religiosa e nenhum valor farmacológico, sendo usados somente por pessoas de baixa renda e nível cultural inferior (Rates, 2001).

Nos últimos anos, apesar das companhias farmacêuticas ainda dominarem o mercado, produzindo medicamentos alopáticos com custos cada vez maiores (Phillipson, 2001), em várias partes da Europa e dos EUA a população tem retornado para natureza, percebendo-se um aumento de interesse em terapias alternativas e pelo

uso de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas (Cordell, 1995). Nota-se também um aumento na utilização de ervas medicinais para o tratamento de problemas tais como, insônia, ansiedade, obesidade, bronquite asmática, gripes, gengivite, infecções, eczemas, etc. Este interesse está relacionado com os seguintes fatos: ineficácia da medicina convencional (efeitos colaterais e terapias inadequadas); uso abusivo e/ou incorreto de fármacos sintéticos que ocasionam efeitos adversos; desenvolvimento de novas doenças com sérias complicações, para as quais não existem ainda um tratamento adequado; crença de que os medicamentos à base de plantas são inócuos, se comparados com os fármacos convencionais; idéia de que “se é natural só pode ser bom”; e a atenção especial que movimentos ecológicos tem dado às ervas medicinais. Entretanto, o uso de algumas substâncias derivadas de plantas medicinais nem sempre é autorizada pelos órgãos legais responsáveis pela fiscalização da segurança e eficácia destas, e uma grande variedade delas ainda não foram submetidas a um rigoroso teste científico, sendo sua qualidade extremamente variável (Capasso et al., 2000).

Tem-se observado um grande avanço científico relacionado a estudos químicos e farmacológicos de plantas, buscando isolar novos compostos com propriedades farmacêuticas. Nota-se um aumento no número de trabalhos apresentados em congressos, artigos publicados em revistas nacionais e internacionais e periódicos especializados nesta área (Cechinel Filho & Yunes, 1998). Houve também um grande desenvolvimento de novas técnicas químicas de análise, tais como as espectrométricas: Infra Vermelho (IV); Ressonância Magnética Nuclear de Próton e de Carbono (RMN ^1H e ^{13}C); Espectroscopia de Massa (EM) e Cristalografia de Raio X, agilizando o processo de identificação das estruturas de compostos químicos (Phillipson, 2001).

Segundo estimativas de 1997, o mercado mundial informal de produtos fitomedicinais movimentou cerca de 10 bilhões de dólares, tendo um crescimento anual de 6,5 %. A Organização Mundial de Saúde (OMS) utiliza a fitoterapia em seus programas de saúde e indica procedimentos básicos para validação de fármacos derivados de plantas nos países em desenvolvimento. A China e a Índia tem indústrias

bem estabelecidas de medicamentos naturais e países latino-americanos têm investido em programas de pesquisa de plantas medicinais para a padronização e regulamentação de produtos fitomedicinais, seguindo o exemplo de países europeus como a França e a Alemanha (Rates, 2001).

As aplicações medicinais do taxol e da artemisina reavivaram o interesse em plantas como fonte de novos fármacos. Apesar de que a maioria dos agentes clínicos são originalmente sintéticos, observou-se que mais de 6 entre 20 prescrições farmacêuticas feitas em 1996 eram produtos naturais, e mais de 50% destas podem ser relacionadas a produtos naturais. Nestes últimos anos, o desenvolvimento de testes biológicos mais sensíveis, principalmente pela indústria, tem aumentado a eficiência e a confiabilidade dos “screenings”, que são testes de triagem em larga escala (HTS: High Throughput Screening) (Yunes et al., 2001). Estes testes são feitos automaticamente, e é possível para uma companhia farmacêutica realizar cerca de 50.000 testes biológicos por dia. Os testes de “screening” são baseados em enzimas específicas presentes em animais, ou em rotas biossintéticas microbianas. Novos “screenings” são continuamente introduzidos e baterias de compostos, sintéticos ou naturais, têm sido testadas em série. Por isso, bancos de compostos ou extratos são necessários para teste biológicos industriais (Phillipson, 2001).

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos já testou mais de 50.000 amostras de plantas para a atividade anti-HIV e 33.000 amostras para a atividade anti-tumoral. Grandes companhias farmacêuticas como a Merck, CIBA, Glaxo, Boehringer e Syntex, têm investido no estudo de novos fármacos ou compostos derivados de fontes naturais, e possuem departamentos específicos dedicados somente a estes estudos (Rates, 2001). Entretanto, estima-se que existem de 250.000 a 500.000 espécies de plantas, e a maioria delas não tem suas atividades fitoquímicas e farmacológicas detalhadamente investigadas (Cechinel Filho & Yunes, 1998; Phillipson, 2001; Rates, 2001). Algumas plantas têm sido submetidas a testes específicos para atividade cardíaca, por exemplo, e não são submetidas para outro tipo

de atividade. Existe ainda uma grande necessidade de se desenvolver novos fármacos ativos contra o câncer, viroses, problemas cardiovasculares, e principalmente, contra as doenças tropicais e aquelas ocasionadas pelo mau funcionamento do sistema nervoso central (mal de Alzheimer e Parkinson, epilepsia, dor, esquizofrenia, distúrbios do sono) (Phillipson, 2001).

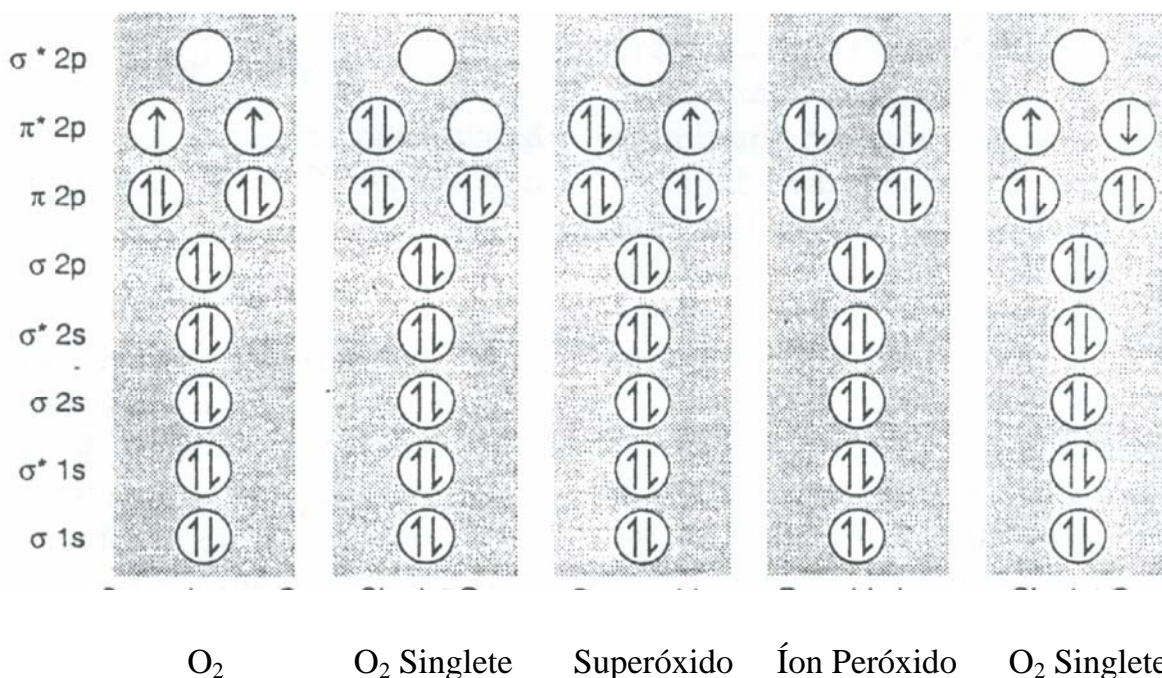
O desenvolvimento de novos fármacos é um processo multidisciplinar e exige uma maior integração entre as áreas da botânica, química e farmacologia. Exige também, um maior investimento da indústria e dos órgãos públicos, bem como um maior acessibilidade dos resultados de testes biológicos realizados com plantas, para que a pesquisa de produtos naturais possa ter um maior avanço (Rates, 2001).

1.2. RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

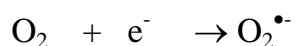
Durante o processo evolutivo dos seres vivos, iniciado há cerca de quase 4 bilhões de anos atrás, haviam formas unicelulares e anaeróbicas povoando algumas partes da biosfera aquática, decorrente de sucessivas modificações físico-químicas no universo. No processo de transformação de energia, promoveu-se o início da incorporação do oxigênio sob forma molecular gasosa pela atividade fotossintética de algas cianofíceas (há cerca de aproximadamente 3 bilhões de anos atrás), dando origem, muito recentemente, à forma humana que se apresenta hoje (Karlsson, 1997). Exceto para aqueles organismos que estão especialmente adaptados a viver em condições de anaerobiose, todos os animais e plantas requerem oxigênio para uma eficiente produção de energia (Halliwell e Gutteridge, 1998).

A compreensão do processo pelo qual as células dos organismos superiores obtém boa parte de sua energia nos remete ao estudo aprofundado do oxigênio e seus efeitos. Contudo, o oxigênio molecular, O_2 , em seu estado fundamental, constitui-se num birradical de 16 elétrons (ver fig. 1), configurando átomos com oito elétrons, pelo compartilhamento de dois pares de orbitais (Signorini e Signorini, 1995).

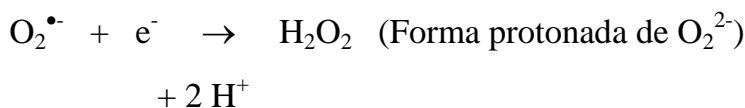
FIGURA 1- CONFIGURAÇÃO DO ORBITAL MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE OXIGÊNIO



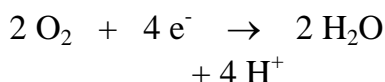
Radicais livres ou Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), são definidos como espécies moleculares capazes de uma existência independente, os quais contém um ou mais elétrons desemparelhados, sendo geralmente muito reativos (Halliwell & Gutteridge, 1998). O átomo de hidrogênio com um elétron desemparelhado, é um radical livre e a molécula de oxigênio (O_2), que ocorre naturalmente, pode ser qualificada como um radical, já que tem dois elétrons desemparelhados (ver fig. 1), cada um localizado num orbital π antiligante diferente, tendo os dois elétrons o mesmo número quântico de spin (isto é, tem spins paralelos). Este é o estágio mais estável do oxigênio; se um elétron for adicionado a esta molécula, ele terá que entrar em um destes orbitais π antiligante. O produto originado será o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) o qual tem um elétron desemparelhado:



A adição de outro elétron nos dá o íon peróxido (O_2^{2-}), o qual é imediatamente protonado para produzir o peróxido de hidrogênio:

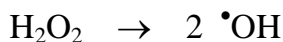


A redução de quatro elétrons de duas moléculas de oxigênio leva à formação de água:



O oxigênio singlete é gerado por um excitação, ou seja um acréscimo de energia, este não é um radical, pois não possui elétrons desemparelhados mas é uma molécula com forte poder oxidante. O oxigênio singlete é originado em sistemas biológicos em um grande número de pigmentos como a clorofila, o retinal e as flavinas, quando são iluminados na presença de oxigênio.

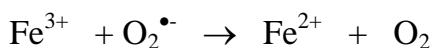
A terceira espécie de oxigênio encontrada nos sistemas biológicos é o radical hidroxil ($\bullet OH$), o qual pode ser gerado por dois tipos de mecanismos. O primeiro consiste na fissão homolítica do peróxido de hidrogênio:



O segundo é por meio da reação do peróxido de hidrogênio com íons de metais de transição (reação de Fenton):



Na presença de quantidades traço de ferro, o superóxido pode reduzir o Fe^{3+} para oxigênio molecular e Fe^{2+} :



Estas duas últimas reações podem se perpetuar continuamente, produzindo radicais hidroxil pela reação de Haber-Weiss:



Sem a presença do ferro catalisando a reação, ela se processará lentamente. Por esta razão o ferro é cuidadosamente “sequestrado” por uma variedade de proteínas (transferrina e hemopexina), durante o transporte (receptores de transferrina),

internalização (endosomas) e estocagem (ferritina e hemosiderina), para limitar a eficácia do ferro nas reações que geram radicais livres (Marshall & Bangert, 1995).

No processo respiratório tem-se, seja em maior ou em menor escala, a formação de espécies intermediárias instáveis de oxigênio, as chamadas ERO (Espécies Reativas de Oxigênio). As ERO são moléculas altamente reativas, a maioria apresentando um tempo de vida incrivelmente fugaz, da ordem de milésimos a bilionésimos de segundo. Apesar da breve existência, possuem um certo instante de vida livre, no qual procuram reagir com a matéria circundante e assim adquirir estabilidade (Signorini e Signorini, 1995). Outras formas de ERO e espécies relacionadas com o oxigênio, como por exemplo, os radicais peridroxil e peroxil, são formados principalmente nas membranas celulares (Pryor, 1986).

No processo de transformações químicas, grande parte do oxigênio molecular é reduzido à água através das transferências de elétrons na cadeia respiratória. Estima-se que em torno de 98% do oxigênio consumido em organismos aeróbicos é reduzido de forma tetravalente até H_2O (Chance et al., 1979), através da ação da citocromo c oxidase mitocondrial, sem a concomitante geração de ERO, permitindo que a principal via de transferência de elétrons e de energia para a síntese de ATP celular participe apenas particularmente da citotoxicidade decorrente destas formas deletérias (Fridovich, 1979). Mesmo assim, o principal sítio de formação endógena do ânion superóxido estaria localizado na cadeia respiratória mitocondrial (Boveris e Chance, 1973), correspondendo a cerca de 2% do oxigênio consumido, (Chance et al., 1979.; Boveris e Cadenas, 1982). A produção do ânion superóxido é diretamente proporcional ao volume de oxigênio consumido ao nível mitocondrial (Boveris & Chance, 1973; Jones, 1985; De Groot e Littaner, 1989).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerado essencialmente em mitocôndrias e peroxissomos, é uma molécula que, a rigor, não pode ser considerada um radical livre, já que não possui elétrons não pareados, mas possui atividade oxidante e elevada

capacidade de difusão (Halliwell & Gutteridge, 1998). As mitocôndrias encontram-se em todas células aeróbicas de organismos multicelulares, e estão majoritariamente localizadas nos músculos esqueléticos e cardíaco, sendo portanto, fisiologicamente o sítio gerador mais importante de peróxido de hidrogênio nos organismos (Chance et al., 1979).

A produção de HO^\bullet intracelular a partir da reação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ com o H_2O_2 (reação de Haber-Weiss, postulada em 1934), ou a simples mistura de H_2O_2 com metais de transição como ferro e cobre (reação descrita por Fenton em 1984), tem grande significado biológico devido à sua elevada reatividade e nocividade (Pryor, 1986; Fridovich, 1986; Halliwell & Gutteridge, 1998). A elevada reatividade do HO^\bullet , apesar de suas concentrações intracelulares extremamente baixas, cerca de 10^{-18} M, e seu reduzidíssimo tempo de vida-média, cerca de 10^{-9} segundos, conferem uma toxicidade tão elevada para os organismos aeróbicos, que as proteções enzimáticas correspondentes às moléculas geradoras ($\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2), ultrapassam várias vezes as concentrações intracelulares estimadas para seus substratos (Chance et al., 1979). O HO^\bullet é o radical livre mais reativo, pois, na busca imediata de sua estabilidade, este radical transforma as moléculas circundantes em radicais, que, por sua vez, também precisam estabilizar-se. Esta seqüência de eventos é que dá origem às reações em cadeia com os constituintes celulares, oxidando resíduos de aminoácidos produzindo as bases de Schiff, podendo também levar a uma alteração química das bases púricas e pirimídicas, quebrando a fita de DNA. Pode ainda atacar os lipídios de membrana produzindo uma peroxidação lipídica, alterando, assim, a organização da membrana, celular, além de danos a proteínas e a outras moléculas orgânicas (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Outras espécies de radicais livres estão envolvidas no dano celular e, recentemente, o peroxinitrito (ONOO^-), derivado da rápida reação entre o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o óxido nítrico (NO^\bullet), ficou igualmente caracterizado por sua ação deletéria, apesar de não se tratar de um radical livre (Punchard & Kelly, 1996).

A toxicidade do oxigênio é um fenômeno aparentemente contínuo e presente mesmo sob normóxia em organismos aeróbicos sadios dotados de diferentes e específicas defesas antioxidantes (Wilhem Filho, 1994). A partir do descobrimento da enzima superóxido dismutase (McCord & Fridovich, 1969), foi possível verificar mais consistentemente, a hipótese formulada por Gershman et al. (1954), de que a principal causa da toxicidade do oxigênio era decorrente da ação dos radicais livres.

O interesse relativo aos danos provocados pelas ERO ao nível molecular, celular e orgânico, cresceu enormemente durante as últimas décadas, principalmente pelas evidências ou suspeitas vinculando as ERO a diversas patologias humanas e ao processo de envelhecimento (Jenkins & Goldfarb, 1993). Destacam-se especialmente aquelas relacionadas com o sistema imunológico (onde as ERO desempenham também papel de defesa), aparelho respiratório, cardiovascular, neurológico e da visão, ademais de processos ligados à carcinogênese e ao processo de envelhecimento (Ji, 1993; Halliwell & Gutteridge, 1998). Persistem, entretanto, resistências isoladas quanto à real importância dos efeitos e das proteções envolvendo a ação das EROS (Margaritis, 1997).

Diversos autores citam o envolvimento das ERO em um grande número de patologias, como causa secundária de doenças crônico-degenerativas, ao aparecimento de alguns tipos de câncer e ao processo de envelhecimento humano. Neste sentido, à medida que as pessoas envelhecem, ocorre uma diminuição na eficácia do sistema das enzimas antioxidantes, enquanto que a formação de ERO se mantém ou é aumentada (Paolisso et al., 1998). As patologias relacionadas com as ERO estão associadas às deficiências genéticas e/ou ambientais. Nesse contexto, as doenças de natureza genética (a hemocromatose idiopática, a doença de Wilson e as doenças de Alzheimer e Parkinson), estão ligadas a uma falha na codificação para a síntese de determinadas enzimas, o que promove o aumento da geração das ERO, ou então omite a resposta defensiva contra tais EROS (Signorini & Signorini, 1995).

O metabolismo dos seres oxigênio-dependentes está frente a um paradoxo vital: a imprescindibilidade do O_2 para a manutenção da vida e, por outro lado, sua potencial toxicidade diante de várias vias oxidativas defectíveis no processo respiratório. A geração de ERO dá-se de modo contínuo no curso do metabolismo

humano, normalmente situando-se em níveis toleráveis, o que possibilita um controle antioxidante satisfatório pelos meios possíveis de inativá-los. Entretanto, existem algumas condições favorecedoras da geração das ERO, e que são inerentes às atividades normais do ser humano, tais como, a exposição prolongada à radiação solar, camada de ozônio, presença de poluentes no ar, água e alimentos, tabagismo, distúrbios genéticos e a ação de certos fármacos (De Bem, 2001).

1.2.1. Defesas Antioxidantes

Halliwell & Gutteridge (1998), definem como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Esta definição compreende compostos de natureza enzimática e não enzimática. Através de diferentes mecanismos, as ERO são inativadas de forma a impedir reações posteriores de propagação (Sies, 1993).

1.2.2. Proteções Antioxidantes Enzimáticas

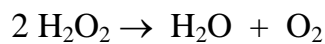
As principais defesas antioxidantes enzimáticas (fig. 2) celulares são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e a glutathione peroxidase (GPx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das ERO. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxil (Boveris & Cadenas, 1997).

A SOD, presente na quase totalidade dos organismos eucarióticos, catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1969). Durante o processo de dismutação, duas moléculas de ânion superóxido reagem sequencialmente, resultando na redução (ganho de elétrons) de uma, e oxidação (perda de elétrons) de outra (Fridovich, 1979):



Existem três isoformas conhecidas de SOD, que consiste numa metaloproteína: uma com átomo de ferro, encontrada somente em bactérias; outra com manganês, existente em bactérias e mitocôndrias; e a forma citosólica dos eucariontes, ostentando duplamente átomos de cobre e zinco junto a seus grupos prostéticos (Fridovich, 1979).

As ações da catalase (localizada principalmente em nível de peroxissomas), e da enzima glutathione peroxidase (maioritariamente citosólica), incidem sobre a metabolização/degradação do peróxido de hidrogênio. A catalase decompõe o H_2O_2 em água e O_2 (Faber et al., 1990):



Com exceção de algumas bactérias, algas cianofíceas e alguns parasitas helmintos, a maioria das células aeróbicas possuem atividade catalásica (Halliwell & Gutteridge, 1998). Nos animais, a catalase está presente em todos os principais órgãos do corpo, especialmente no fígado e nos eritrócitos, exceção às hemácias de algumas espécies de peixes (Wilhelm Filho et al., 1996). O cérebro, o coração e o músculo esquelético contêm somente pequenas quantidades de catalase (Halliwell & Gutteridge, 1998).

As peroxidases são enzimas que utilizam doadores de elétrons para reduzir, por exemplo, H_2O_2 em H_2O (Litle & O'brien, 1968; Christophersen, 1969). Talvez a mais importante das peroxidases seja a glutathione peroxidase (GPx), enzima que possui selênio em seu sítio catalítico e utiliza o tripeptídeo tiólico glutathione reduzida (GSH), como doador de elétrons para a redução de H_2O_2 e de outros peróxidos orgânicos, como os lipoperóxidos provenientes da lipoperoxidação lipídica. Durante o processo catalisado pela GPx ocorre a oxidação da glutathione, formando-se uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH, (GSSG) A relação de concentração entre GSH/GSSG deve ser alta para a manutenção do poder redutor intracelular (Kelling & Smith, 1982; Kappus, 1987). A ação combinada do trinômio enzimático (SOD, CAT e GPx) (fig. 2), mantém a célula com concentrações reduzidas de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , evitando

aumentos na geração de HO^\bullet (Chance et al., 1979), constituindo uma estratégia comum a todos os organismos aeróbicos.

Existem enzimas acessórias que participam auxiliando na manutenção do poder redutor intracelular, tais como a glutathione redutase (GR), pois continuamente recupera a GSH através da GSSG. Além disso, a ação da glutathione-S-transferase (GST), constitui um importante componente do metabolismo de xenobióticos (Forman et al., 1997). Importante também é a contribuição da GSH na reciclagem de dehidroascorbato a ascorbato, por uma via enzimática onde a GSH-dehidroascorbato-redutase é preponderante (Coassin et al., 1991; May et al., 1997; Mendiratta et al., 1998a, b).

Tem sido sugerido que numerosas substâncias possuem atividade antioxidante. Existem várias pesquisas na área de química, bioquímica e química de alimentos relacionada a este assunto (Lugasi, 2000). Estas pesquisas têm revelado que vários compostos fenólicos, tais como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas, xantonas e procianidinas, têm apresentado promissora atividade terapêutica para patologias causadas por ERO, por sua capacidade de “seqüestrar” estes radicais (Potterat, 1997; Yokozawa et al., 1997; Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1999).

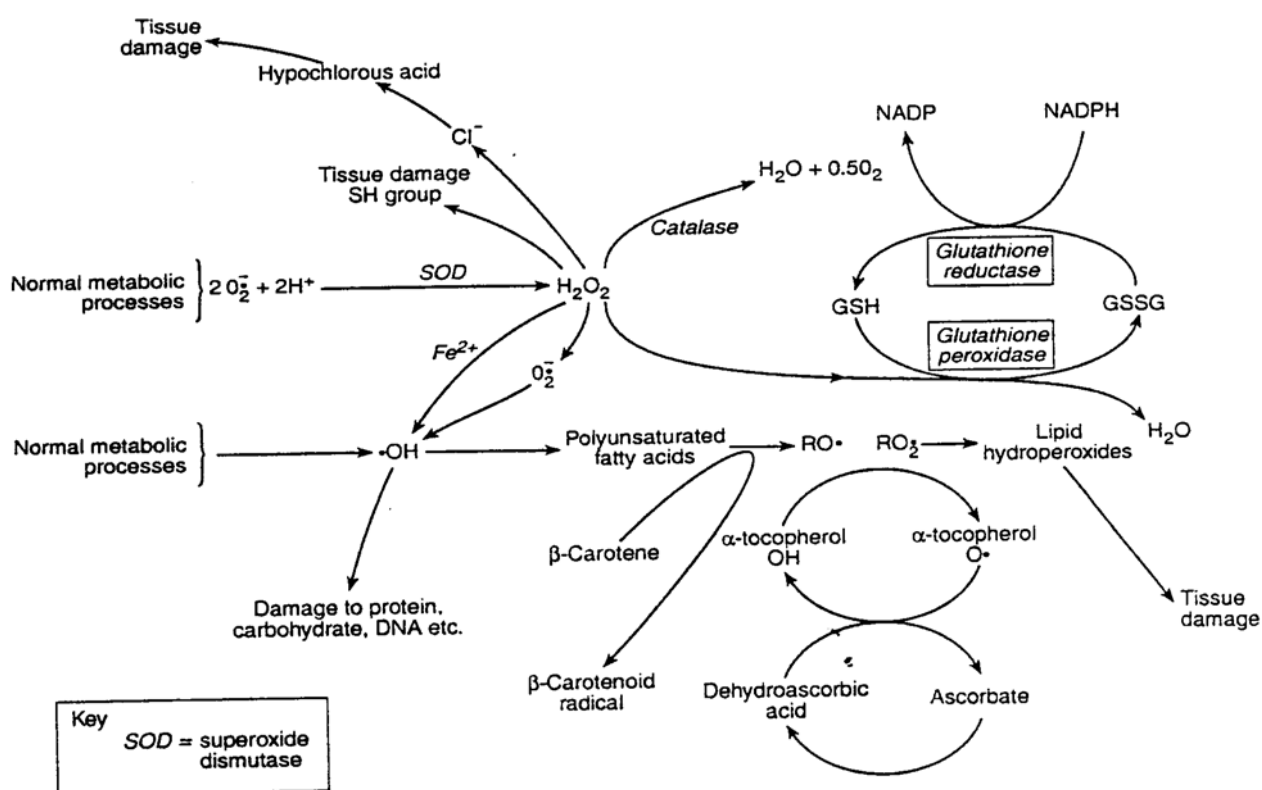
A vitamina C, presente como ascorbato na maioria dos organismos biológicos, é considerada entre os mais importantes antioxidantes dos fluidos extracelulares (Stocker & Frei, 1991). O ascorbato tem sido mostrado como um eficiente “seqüestrador” (*scavenger*) de $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^\bullet e do radical peroxil ($^\bullet\text{OOL}$), (Rose, 1987). O ascorbato age protegendo biomembranas contra a peroxidação, perpetuando, desta forma, a atividade do α -tocoferol, um antioxidante não enzimático lipossolúvel.

A reatividade da vitamina E com $^\bullet\text{OOL}$, protegendo a membrana lipídica de ataques de ERO, ocorre por sua atividade antioxidante e, acredita-se, seja a sua mais importante função bioquímica *in vivo* (Tappel, 1962). Tal reatividade é de considerável importância, porque tocoferóis reagem com $^\bullet\text{OOL}$, produzindo um

hidroperóxido relativamente estável (LOOH), e um radical tocoferoxil, interrompendo a cadeia de propagação de ERO (Sies et al., 1993).

Além da função de precursores de vitamina A, os carotenóides têm sido caracterizados por exibirem uma característica biológica adicional, atuando como eficientes “scavengers” de ERO (Burton & Ingold, 1984; Sies, 1993). Outros grupos têm descrito o β -caroteno como um agente inibidor de peroxidação lipídica, seqüestrando $\cdot\text{OOL}$, desta forma interrompendo a cadeia de propagação das ERO (Krinsky & Deneke, 1982; Burton & Ingold, 1984; Kennedy & Liebler, 1992; Pallozza et al., 1992).

FIGURA 2 - ESQUEMA DE AÇÃO DA DEFESAS ANTIOXIDANTES



Interrelationships between cytoprotective enzymes, antioxidants and free radicals.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Extrair, isolar e identificar os compostos ativos da *Equisetum arvense* L. e da *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze, e analisar o seu potencial antioxidante.

2.2. ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Extrair, isolar e purificar os compostos ativos destas plantas por meio das técnicas de partição líquido-líquido e cromatografia líquida em coluna (líquido-sólido e de exclusão);
- 2.2.2. Identificar os compostos isolados pelos métodos de CCD e pelos métodos espectroscópicos de IV, RMN¹H e ¹³C;
- 2.2.3. Avaliar a citotoxicidade do extrato bruto, frações e compostos isolados;
- 2.2.4. Testar os extratos, bem como as frações e compostos puros “in vivo” e “in vitro” em modelos específicos, para verificar o seu potencial antioxidante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Equisetum arvense* L.

3.1.1. CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS

Esta planta pertence à classe *Articulatae*, ordem *Equisetales* e à família das *Equisetaceae* a qual também estão incluídas as *Equisetinae* que são consideradas fósseis datando do fim do período Paleozóico, no Carbonífero Superior (300 milhões de anos atrás) (Corrêa, 1984; Mitich, 1992). O único gênero vivo de toda classe, *Equisetum*, pertence a esta família, sendo extremamente variável em sua morfologia principalmente as plantas híbridas (Veit et al., 1994), incluindo aproximadamente 25 espécies em todo o mundo, entre as quais destacam-se a *E. palustre*, *E. telmateia*, *E. pratense*, *E. sylvaticum*, *E. fluviatile*, *E. arvense* e *E. bogotense*. A maioria é constituída de plantas pequenas, que raramente atingem 1 m de altura. As *Equisetums* são, não somente nativas da América do Norte, indo do Alasca até sul da Califórnia, podendo ser também encontradas em toda Europa e nas ilhas Britânicas (Mitich, 1992). No Brasil podem ser encontradas em toda região central (Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), onde ocorrem como uma espécie cujo caule delgado apoia-se sobre outras plantas, podendo atingir até 12 m de comprimento (Corrêa, 1984).

A aproximadamente 2000 anos atrás Plínio, um naturalista romano, deu a cavalinha, ou cavalinha do campo, “horsetail” ou cola de cavalo (Mitich, 1992; Cetto et al., 2000), o nome de *Equisetum arvense*, o qual Carolus Linnaeus (1707-1778) inseriu em seu *Species Plantarum* em 1753, (Mitich, 1992), sendo este seu nome botânico derivado do latim *equi* = cavalo, *setum* = cauda (Teske e Trentini, 1995). São plantas perenes que se reproduzem por esporos e por rizomas tubulares (por baixo da superfície do solo). Possuem caules ocos, cilíndricos, sem folhas, constituídos de nós e internós, de textura rugosa e cor marrom clara, com pontas amareladas em forma de lança, onde se encontram os esporos, podendo atingir de 10 a 25 cm de altura (Mitich,

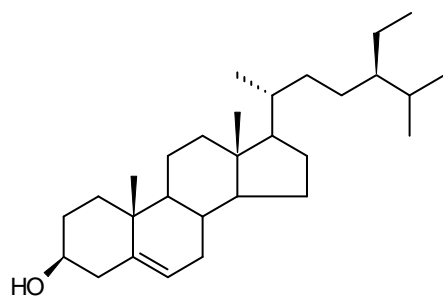
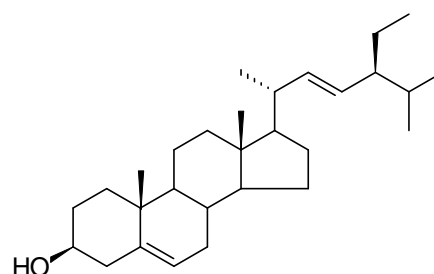
1992). Apresentando bainha dentada caliciforme, presa pela base ao nó do caule. Desta bainha partem ramificações verticiladas e articuladas. Os ramos férteis aparecem numa determinada época do ano para cada espécie, onde os estemas com os esporos são seguidos por ramos verdes em forma de pluma com 10 a 50 cm de comprimento, se assemelhando a um rabo de cavalo (Cemtchujnicov, 1976) (fig.4). As raízes da cavalinha tem uma grande capacidade de retirar nutrientes do solo, inclusive metais como ouro e quantidades significantes de cobalto, cálcio e sílica aos quais são atribuídas a atividade fungicida (Mitich, 1992).

A cavalinha é muito usada na medicina popular para combater a tuberculose, problemas de pulmão, hemorragias internas, retenção de urina (incontinência urinária noturna de crianças e idosos), problemas da próstata, osteoporose, úlceras gástricas, perda de sangue do nariz, da boca e do reto e para tratamento da celulite (Franco, 1997). Além destas pode-se citar também seu uso como diurética, para controlar o colesterol e para o tratamento de peles senis. É utilizada na Europa como abrasivo e polidor de metais devido a presença de sílica (Mitich, 1992; Lemus, 1996).

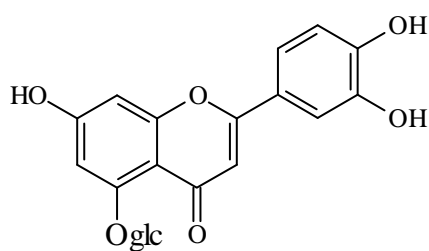
3.1.2. ESTUDOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS

Os primeiros estudos químicos da *Equisetum arvense* datam de 1940, quando Nakamura e Hukuti, conseguiram identificar alguns flavonóides glicosilados (quercetina-3-glicosídeo, canferol-7-diglicosídeo e luteolina-5-glicosídeo). Mais tarde, Saleh et al. (1972), publicaram um artigo descrevendo dois novos flavonóides: canferol-3-glicosídeo e canferol-7-glicosídeo (fig. 3). Porém nos últimos anos (década de 80 e 90), com o aperfeiçoamento das técnicas químicas de análise, é que houve um estudo mais aprofundado desta planta. Em 1984, uma mistura dos esteróis β -sitosterol, campesterol, isofucoesterol, foi isolada e identificada por Dagostino et al. Nos anos 90 foi bastante investigada por Veit et al., (1994), que identificaram alguns flavonóides e flavonas glicosilados derivadas da quercetina, luteolina, estilipironas, derivados do

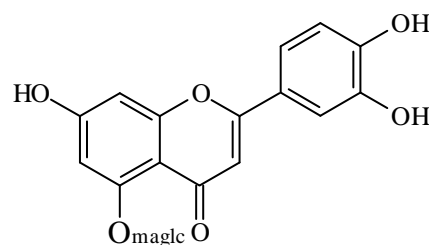
ácido tartárico e cafeico, ácido clorogênico, entre outros (Veit et. al., 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995). Apesar da cavalinha ser muito utilizada na medicina popular, existem poucos trabalhos farmacológicos relacionados com *E. arvense*. Algumas espécies, como a *E. fluviatile*, *E. hiemale* (Gutiérrez, 1985), *E. giganteum* e *E. bogotense* (Lemus, 1996), são reportadas por terem atividade diurética. É também descrito na literatura que a espécie *E. myriochaetum* tem uma atividade hipoglicemiante em diabéticos (Cetto, 2000).

FIGURA 3 – ALGUNS COMPOSTOS ISOLADOS ANTERIORMENTE DA *Equisetum arvense* β -Sitosterol

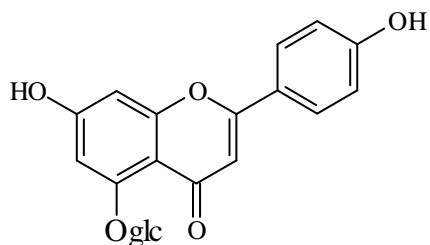
Stigmasterol



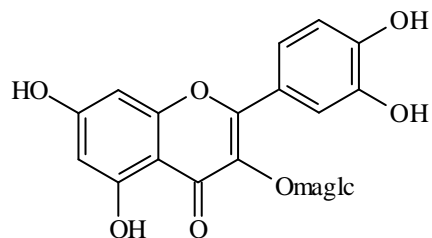
Luteolina 5-O-glucosídeo



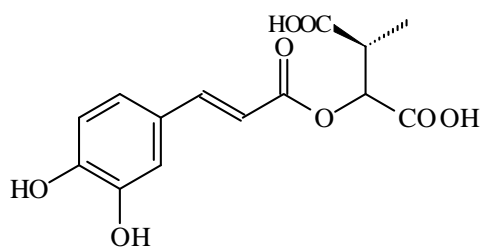
Luteolina 5(6''-O-malonilglucosídeo)



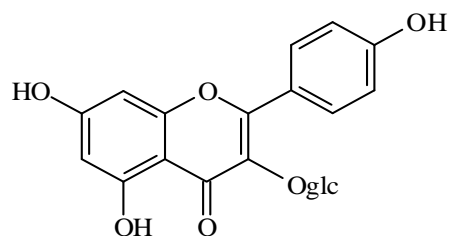
Apigenina 5-O-glucosídeo



Quercetina 3-O-(6'' malonilglucosídeo)



Ácido Dicafeoil-meso-tartárico



Canferol 3-O-glucosídeo

FIGURA 4 - *Equisetum arvense*



3.2. *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze

3.2.1. CARACTERÍSTICAS TAXONÔMICAS

Dentre as Angiospermae, a família Lamiaceae (Labiatae) tem um alto “status” evolucionário, compreendendo aproximadamente 600 gêneros com 3000 espécies, sendo dividida em 8 sub-famílias e 12 tribos (Torre e Harms, 1958). A maioria dos representantes está dispersa na região do Mediterrâneo e no Oriente Próximo (Cemtchujnicov, 1976; Corrêa, 1984). São plantas geralmente herbáceas ou arbustivas, com folhas opostas cruzadas, inteiras, e em geral, com cheiro intenso. Possui flores diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, zigomorfas e bilabiadas, pequenas ou grandes, em geral vistosas, reunidas em densas inflorescências quase sempre axilares. Seu androceu é formado por 2 a 4 estames (Cemchujnicov, 1976). Possui ovário súpero bicarpelar, falsamente tetralocular por invaginação dos carpelos, assente num disco glandular e seu fruto seco separa-se caracteristicamente em 4 núculas.

As espécies de Lamiaceae tem grande importância econômica, possuem óleos etéricos sendo empregadas há muito tempo como ervas medicinais, condimentos e na indústria de perfume (Corrêa, 1984). Alguns exemplares mais frequentes são a salvia, conhecida também como sangue-de-Adão; *Leonotis* e *Leonurus*, popularmente chamados de cordão-de-frade e cordão-de-São Francisco. Existem também os gêneros cultivados que são usados como condimentos: erva-cravo (*Hyptis*), alfavaca (*Ocimum*), alecrim (*Rosmarinus*), hortelã pimenta (*Mentha*), da qual é extraído o mentol, sendo usada também na medicina caseira; manjerição (*Origamum*), manjerona (*Majorana*), basilicão (*Basilicum*), orégano (*Origamum*), tomilho (*Thymus*), erva-cidreira (*Melissa*), também utilizada na medicina popular, e o poejo (*Mentha*), entre muitas outras (Cemtchujnicov, 1976; Corrêa, 1984).

A Ocimoideae é uma sub-família das Lamiaceae, caracterizada pela produção de terpenóides (mono-, sesqui-, di-, e triterpenos), esteróides e flavononóides (especialmente flavonas). Esta sub-família compreende 16 gêneros dentre os quais somente 11 tem sido quimicamente investigados. A *Marsypianthes chamaedrys* (fig. 6) é uma espécie pertencente à sub-família das Ocimoideae, ocorrendo nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, conhecida popularmente como paracará, hortelã-do-mato, betônica-brava, erva-de-cobra, corta-hérpes e bóia-caá, sendo muito utilizada pela população local para combater o veneno de cobra (Menezes et al., 1998a).

3.2.2. ESTUDOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS

Investigações químicas anteriores levaram ao isolamento e a identificação dos esteróides β -sitosterol e stigmasterol, e dos triterpenos ácidos ursólico, oleanólicos e tormentico (fig. 5), das partes aéreas da *Marsypianthes chamaedrys*. Dos estemas desta planta foram isolados os triterpenos não ácidos lupeol, germanicol, α -amirina e β -amirina, bem como o flavonóide rutina (fig. 5) (Menezes et al., 1998a). Posteriormente, foram isolados, também dos estemas, uma mistura do castanopsol, epigermanidiol, chamaedriol e 2 α -hidroxi-lupeol (Menezes et al., 1998b).

Estudos farmacológicos mostraram que esta planta possui atividade analgésica, anti-inflamatória e o seu extrato aquoso indicou uma forte inibição ao veneno de cobra (*Bothrops jararaca*) (Menezes et al., 1998a, Mors et al., 2000). De acordo com as pesquisas de Menezes et al. (1999), a *Marsyphianthes chamaedrys* apresentou uma intensa atividade molucida.

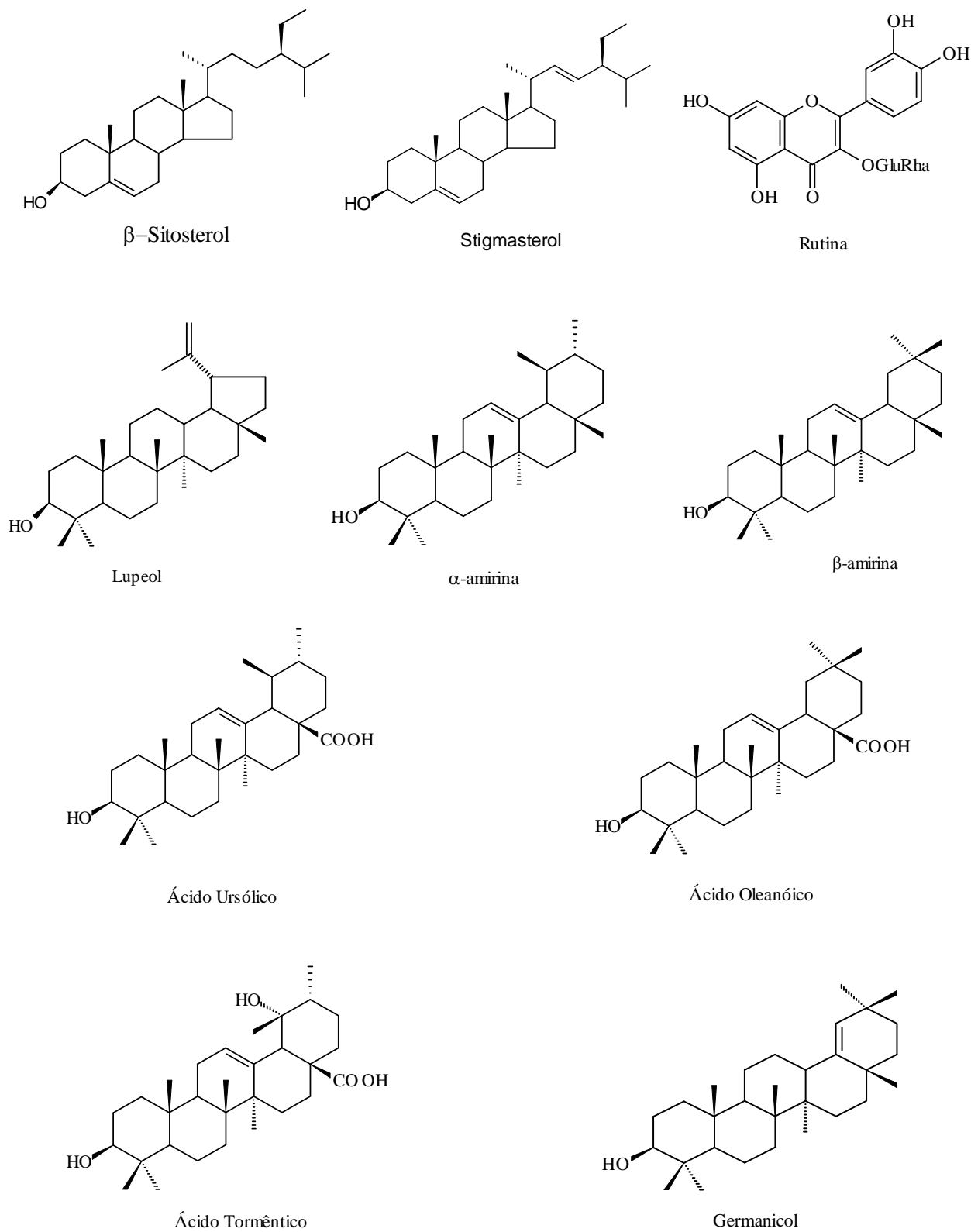
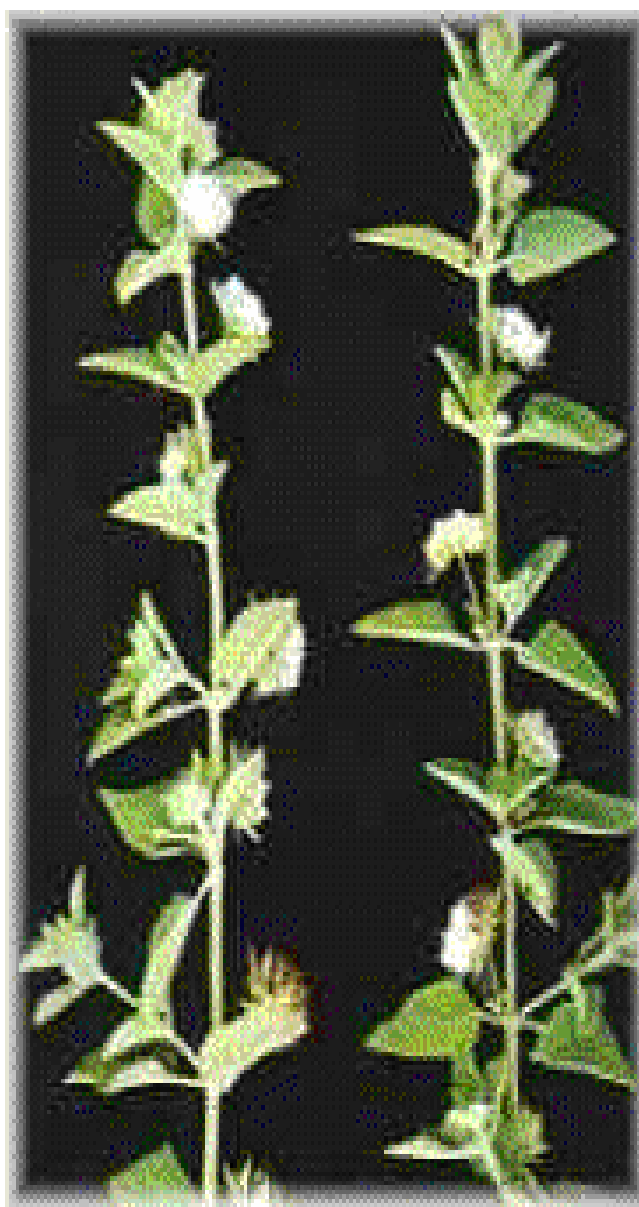
FIGURA 5 – ALGUNS COMPOSTOS JÁ ISOLADOS DA *Marsypianthes chamaedrys*

FIGURA 6 – *Marsypianthes chamaedrys*



4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. Introdução

Durante o desenvolvimento desta pesquisa utilizou-se técnicas experimentais descritas na literatura relacionada ao estudo de plantas medicinais.

A extração dos componentes das plantas foi feita por meio de maceração; uma pré-separação do extrato bruto foi realizada por partição líquido-líquido e ou filtração por cromatografia líquida em coluna (CC), usando sílica gel e solventes de polaridades crescentes; o isolamento e a purificação por meio de cromatografia líquida em coluna; e a identificação por cromatografia em camada delgada (CCD), e por métodos espectrofotométricos de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de próton e de carbono (RMN ^1H e ^{13}C respectivamente).

A concentração do extrato bruto e das frações obtidas na partição e na filtração, foi feita sobre pressão reduzida em evaporador rotatório Rotavapor Büchi RE-120 e com temperatura controlada por banho de água.

4.1.2. Partição (Extração Líquido-Líquido)

A extração líquido-líquido é uma técnica na qual uma solução (geralmente aquosa), é colocada em contato com um segundo solvente (geralmente orgânico), essencialmente imissível com o primeiro, com o objetivo de causar uma transferência de um ou mais solutos para o segundo solvente (Collins et al., 1993).

O extrato total da planta foi diluído em 100 ml de água destilada e colocado em funil de separação; em seguida adicionou-se 100 ml de hexano e o funil foi agitado para ocorrer a extração e após decantação a fração do solvente foi recolhida. Este

processo foi repetido utilizando mais duas porções de 100 ml de hexano, e as frações foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório. Seguiu-se o mesmo procedimento para os seguintes solventes: diclorometano (DCM), acetato de etila (AE) e butanol (BuOH) (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

4.1.3. Métodos Cromatográficos

4.1.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada de fase estacionária consiste de uma placa de material rígido e inerte (vidro, metal ou plástico), revestida com uma fina camada de uma substância adsorvente (ex.: sílica gel ou celulose em pó). O processo de separação ocorre em uma superfície plana bidimensional. Em CCD existe uma variedade de material de revestimento disponível, mas sílica gel é mais frequentemente usada. A CCD é geralmente desenvolvida por uma técnica de ascensão na qual a placa é imersa num solvente de desenvolvimento com uma profundidade de aproximadamente 0,2 a 0,5 cm em um tanque ou cuba de vidro (Collins et al., 1993).

Para as análises em CCD foram utilizadas placas cromatográficas em folhas de alumínio, 0,25 mm ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄, de alta resolução, com camada estacionária de sílica gel 60 com indicador fluorescente. As placas foram cortadas nas dimensões apropriadas para cada situação de análise. A amostra foi aplicada por meio de um tubo capilar a uma altura de $\approx 0,9$ cm, com uma distância de $\approx 0,3$ cm de uma para a outra; em seguida a placa foi colocada em cuba para ser eluída. Para as frações apolares foram utilizadas misturas dos seguintes solventes: hexano/acetato de etila, clorofórmio/metanol e para as frações mais polares acetato de etila/acetona/água, acetato de etila/água/ác. acético/ác. fórmico, entre outros. Após eluídas, as CCDs foram observadas em lâmpadas de UV nos comprimentos de onda curto (254 nm), e longo (360 nm), e em seguida foram reveladas com os reveladores de interesse.

4.1.3.2. Cromatografia Líquida em Coluna (CC)

A cromatografia líquida em coluna abrange várias técnicas de separação tais como: cromatografia líquido-sólido, líquido-líquido, de troca iônica e por permeação em gel (ou de exclusão). Todas estas técnicas envolvem uma fase móvel líquida. A cromatografia líquida mais utilizada é chamada de clássica e caracteriza-se pelo uso de colunas de vidro com diâmetros relativamente grandes, recheadas pela fase estacionária, com a fase móvel percolando a coluna pela ação da gravidade (Collins et al., 1993).

Neste trabalho as técnicas de cromatografia líquida utilizadas foram as de líquido-sólido e as de permeação por gel descritas a seguir.

4.1.3.2.1. Cromatografia Líquido-Sólido

É também chamada de cromatografia por adsorção e baseia-se no fato de o soluto interagir com os centros ativos fixos do adsorvente sólido, finamente dividido, que é a fase estacionária. O adsorvente pode preencher a coluna ou estar espalhado sobre uma placa, sendo em geral um sólido ativo com grande área superficial, como a alumina, o carvão ou a sílica gel (a mais utilizada). O método consiste no fato das moléculas do solvente (fase móvel), competirem pelos sítios de adsorção polar com as moléculas do soluto. Quanto mais forte for a interação entre a fase móvel e a estacionária, mais fraca será a adsorção do soluto e vice-versa (Collins et al., 1993). Para esta pesquisa utilizou-se colunas de diâmetros variados, de acordo com a quantidade de amostra usada, preenchidas com sílica gel (RS $\phi \approx 0,5 \div 0,20$ mm, Carlo Erba). Para a fase móvel utilizou-se solventes de polaridades crescentes como: hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e metanol (Cechinel Filho, 1998).

4.1.3.2.2. Cromatografia por Permeação de Gel (ou de exclusão)

É baseada na separação das substâncias devido ao tamanho e forma de suas moléculas. A fase estacionária deste tipo de cromatografia é constituída por materiais porosos com os tamanhos dos poros estreitamente controlados; o mecanismo de retenção das moléculas do soluto é o da penetração (ou permeação), de cada molécula no interior das partículas do gel. As moléculas muito grandes serão efetivamente excluídas de algumas das aberturas da rede do gel e passarão pela coluna através do volume de líquido intersticial. As moléculas menores podem ir para o interior do gel, de acordo com os respectivos tamanhos e com a distribuição dos tamanhos dos poros, ficando retidas, demorando mais tempo para sair da coluna. Para as fases estacionárias os materiais mais usados são os xerogéis do tipo poliacrilamida (Bio-Gel), e dextrano reticulado (Sephadex), podem ser usadas também micropartículas de copolímeros de estireno-divinil-benzeno (ultrastyrogel), de sílica ou vidro poroso (Collins et al., 1993). Para esta técnica foi utilizada coluna de vidro com 2 cm de diâmetro, recheada com Sephadex LH-20, sendo a fase móvel uma mistura de metanol/água 90:10.

4.2. MATERIAL VEGETAL

4.2.1 *Equisetum arvense*

O material vegetal da *E. arvense* foi fornecido pelo laboratório Vida e Saúde já seco e triturado na forma com que é comercializado.

4.2.2. *Marsypianthes chamaedrys* (Vahl) Kuntze

O material vegetal da *M. chamaedrys* foi fornecido pelo Prof. Dr. Sérgio Ferreira do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

4.3. ANIMAIS

Foram utilizados grupos de ratos machos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar-EPM, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram pesados e distribuídos em três grupos de 6 indivíduos com peso $272 \pm 22\text{g}$ para a *Equisetum arvense*, e em dois grupos de 7 (frações AE e BuOH), e um grupo de 6 indivíduos (Deprenil), para a *Marsipyanthes chamaedrys*.

4.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.4.1. *Equisetum arvense*

4.4.1.1. Extração

Para a extração utilizou-se 500,81 g das partes aéreas da planta seca e moída que foi deixada em maceração com metanol (PA), à temperatura ambiente, durante um período de 10 dias. O solvente foi trocado a cada 24 horas, e as frações assim obtidas foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Cechinel Filho & Yunes, 1998). O extrato seco obtido foi chamado de extrato bruto metanólico e foi acondicionado em frasco âmbar, e em seguida pesado (32,32 g).

4.4.1.2. Fracionamento do Extrato Bruto Metanólico

O extrato bruto metanólico foi fracionado por partição líquido-líquido com: hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AE) e butanol (BuOH). As frações dos solventes acima foram concentradas em rota-evaporador, e após evaporação total do solvente para cada uma delas, foi feita análise por cromatografia em camada delgada (CCD), (tab. 1), usando como eluente HEX/AE 80:20, e revelando com anisaldeído e aquecimento, que mostrou que a partição não foi eficiente. Pesou-se

então 10g do extrato bruto metanólico para uma nova separação por cromatografia líquida em coluna (CC) líquido sólido (Cechinel Filho & Yunes, 1998). Preparou-se uma pastilha com as 10g da amostra, dissolvidas em metanol, e 30g de sílica gel, usando coluna de vidro de 10cm de diâmetro, sílica gel para recheio e hexano para empacotar a sílica. A coluna foi eluída com: hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AE) e metanol (MeOH). Cada uma das frações foi concentrada até eliminação do solvente e pesadas posteriormente.

Cada uma das frações citadas acima foi monitorada por CCD, utilizando os eluentes e reveladores descritos na tabela abaixo:

TABELA 1 – ELUENTES E REVELADORES UTILIZADOS PARA O MONITORAMENTO DAS FRAÇÕES DA *E. arvense*.

Eluentes	HEX/AE 80:20	HEX/AE 70:30	AE/ACET/H ₂ O 25:5:1	EtOH/Piridina/H ₂ O/MeOH 80:12:10:5
Reveladores				
Anisaldeído +	HEX	HEX		
Aquecimento	DMC	DCM		
Dragendorf			AE	
			MeOH	
Cloreto Férrico		AE	AE	
			MeOH	
Ác. Sulfúrico +				MeOH
aquecimento				AE

Devido à análise por CCD, as frações de maior interesse foram: DCM e MeOH, e estas frações foram refracionadas por CC.

4.4.1.3. Fracionamento da fração DCM

O fracionamento foi feito por CC líquido-sólido, utilizando coluna de 4cm de diâmetro, sílica gel para recheio e hexano para empacotar a coluna. Para a pastilha utilizou-se 500 mg da fração e 2,24g de sílica. Eluentes: hexano, HEX/AE 95:5,

HEX/AE 90:10, HEX/AE 80:20, HEX/AE 50:50; AE e MeOH. Obteve-se 50 frações que foram monitoradas por CCD, eluídas com HEX/AE 80:20, e reveladas com anisaldeído e aquecimento. As frações de maior interesse foram as de 14 a 23, que foram reunidas e realizada uma nova placa com padrão de β -sitosterol/stigmasterol. A fração reunida foi então lavada com éter, filtrada e o sólido obtido foi seco, pesado e enviado para análise de IV e RMN ^1H .

4.4.1.4. Fracionamento da fração MeOH

O fracionamento foi feito por CC por permeação de gel (ou de exclusão). 100mg da amostra foram dissolvidas em metanol e adicionada em coluna de 2cm de diâmetro, com Sephadex LH 20 como recheio e MeOH/H₂O 90:10 como fase móvel. Desta coluna obteve-se 15 frações que foram monitoradas por CCD, eluídas com clorofórmio/metanol 50:50 e reveladas com cloreto férrico. A fração 4 mostrou-se pura e após evaporação espontânea do solvente, foi pesada (17,8 mg), e enviada para análise por IV e RMN ^1H .

4.4.2. *Marsypinthes chamaedrys*

4.4.2.1. Extração

A extração foi feita com 925g das partes aéreas da planta seca e moída, macerando-se com uma mistura de 2 para 1 de metanol (MeOH) e água (H₂O), por um período de 10 dias, trocando o solvente a cada 24 horas. As frações do solvente foram reunidas e concentradas até 90% de evaporação do solvente. O extrato assim obtido, foi chamado de extrato bruto hidroalcoólico, colocado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração.

4.4.2.2. Fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico

O extrato bruto foi fracionado por partição líquido-líquido, solubilizando este extrato em MeOH/H₂O 6:4 e extraindo sucessivamente com 6 partes de 100 ml de cada um dos seguintes solventes: hexano (HEX), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AE) e butanol (BuOH). Cada uma das frações foi concentrada sob pressão reduzida em rota evaporador até eliminação completa do solvente, e em seguida foram pesadas.

4.4.2.3. Fracionamento da Fração AE

Esta fração foi também refracionada, utilizando o mesmo método de CC líquido-sólido. A pastilha foi preparada solubilizando 2,13g desta fração em MeOH/Acetona 1:1, e utilizando 4,00 g de sílica. O diâmetro da coluna de vidro foi de 4 cm, com sílica gel como recheio e clorofórmio para empacotamento da coluna. Para fase móvel foram utilizados os seguintes solventes: clorofórmio; clorofórmio/metanol 5%, 10%, 20% e 50% metanol. Recolheu-se 144 frações que foram analisadas por CCD. As placas das frações de 5 a 70 foram eluídas com CHCl₃/MeOH 80:20, as de 71 a 120 foram eluídas com CHCl₃/MeOH 70:30 e as demais com CHCl₃/MeOH 60:40. Todas as placas foram reveladas com cloreto férrico. De acordo com esta análise por CCD, as frações que se mostraram mais puras foram as de 32 a 43 e as de 54 a 68, as quais foram reunidas e, após evaporação do solvente, pesadas e enviadas para elucidação estrutural por IV e RMN¹H.

4.4.2.4. Fracionamento da fração BuOH

O fracionamento foi feito por CC, sendo a pastilha preparada com 1g desta fração e 2g de sílica. A coluna de vidro tinha diâmetro de 4 cm, para o recheio foi usada sílica gel e para o empacotamento da coluna clorofórmio. Como fase móvel foram usados os seguintes solventes: clorofórmio/metanol 10%, 20%, 30%, 40%, 50%

e metanol. Obteve-se 85 frações que foram acompanhadas por análise de CCD. As frações que aparentaram maior interesse foram 6-13, e 30-38, que foram reunidas, evaporadas, pesadas e enviadas para elucidação estrutural.

4.5. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE

4.5.1. Teste de Toxicidade Sobre *Artemia salina* (TAS):

Os teste de toxicidade sobre *Artemia saliana* (TAS) foram realizados segundo o método de McLaughlin (1991). Foram utilizados 0,5; 1,0 e 2,0 mg/ml do extrato bruto metanólico e da fração AE da *Equisetum arvense*; 0,5 e 1,0 do extrato bruto hidroalcoólico, fração AE e clorofórmio da *Marsypianthes chamaedrys*. Os extratos foram dissolvidos em solução salina (38g/l), onde as larvas de *A. salina* (n=10) foram incubadas por 24 horas; após este período foi realizada a contagem dos animais mortos e calculada a LC₅₀. Consideram-se ativos os extratos e/ou frações que tenham LC₅₀ (concentração necessária para provocar óbito em 50 % das larvas testadas), inferior a 1000 mg/ml.

4.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE “IN VIVO”

O tratamento utilizado foi realizado pela administração de 0,5 ml do controle negativo (água destilada), do controle positivo (cloridrato de selegelina - Deprilan[®] (deprenil), 0,5 mg/rato), extrato bruto metanólico da *Equisetum arvense* (50 mg/rato), fração acetato de etila (14 mg/rato), e fração butanólica (14 mg/rato) da *Marsipyranthes chamaedrys*. Os animais foram tratados com a dose acima mencionada, por via intraperitonal, por um período de 14 dias, após os quais foram sacrificados por deslocamento cervical. O terço do córtex frontal e *striatum* do cérebro foram retirados. Estes tecidos foram homogeneizados e feitas as determinações dos indicadores de estresse oxidativo.

4.6.1. Preparação das Amostras

4.6.1.1. Homogenato

Após a retirada do terço do córtex frontal e *striatum* do cérebro (acondicionados imediatamente em gelo), uma pequena porção foi retirada e pesada para a preparação dos homogenatos. Obtidos em tampão fosfato do sódio 20 mM, pH 7,4 contendo 0,1% de Triton X-100 e 150 mM de cloreto de sódio (1:20 p/v). A homogeneização foi realizada a 4°C, cp, com cerca de 20 impactos em homogeneizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrifugação a 10.000g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram mantidos a - 170°C até sua utilização para diferentes análises enzimáticas (SOD, CAT, GR, GPx, GSH, GT e GST), bem como do dano celular (TBARS), através de espectrofotometria.

4.6.1.2. Extrato Ácido

Porções do terço do córtex frontal *striatum* do cérebro foram precipitadas com ácido tricloroacético 12% (1:20 p/v) e homogeneizadas com cerca de 20 impactos em homogeneizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrifugação a 10.000g durante 10 minutos. Imediatamente após, foi realizada a determinação dos tióis não-protêicos (GSH, GT e GSSG) nestes sobrenadantes.

4.6.2. Atividade dos Marcadores de Estresse Oxidativo e das Defesas Antioxidantes

4.6.2.1. Avaliação da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicatas, pelo da detecção em A₅₃₅ nm dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o

malondialdeído, ou MDA, produzindo uma base de Shiff de coloração rosa (Bird & Draper, 1984). Os homogenatos foram precipitados com ácido tricloracético (TCA) a 12% e agitados vigorosamente. Em seguida foram incubados em tampão Tris-HCl 60 mM, pH 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 minutos a 100°C. Após, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C e centrifugados (5 min a 10.000g), e a absorbância do cromóforo medida em 535 nm, sendo os valores expressos em TBARS $\mu\text{mol g}^{-1}$.

4.6.2.2. Defesas Antioxidantes Enzimáticas

4.6.2.2.1. Glutathione S-Transferase (GST)

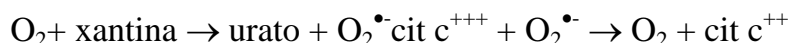
A atividade da Glutathione S-Transferase foi medida espectrofotometricamente em 340 nm, de acordo com Keen et al. (1974). A amostra foi adicionada em um meio contendo 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), glutathione reduzida 0,1 M (GSH) e tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, contra um branco de tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0. As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade da enzima expressos em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$.

4.6.2.2.2. Catalase

Para a análise da atividade desta enzima, utilizou-se o método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, em 240 nm durante 20 segundos, pela enzima presente na amostra. Utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM e pH 7,0, preparada e titulada no dia da análise. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em $\text{mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$.

4.6.2.2.3. Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 550 nm, de acordo com o método de Flohé & Ötting (1984). A SOD presente na amostra inibe a redução do citocromo c promovida pelo ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) oriundo do sistema xantina/xantina oxidase:



Utilizou-se solução de citocromo C/xantina em pH 7,8, com solução de xantina oxidase (0,4 U/ml), ambas mantidas em banho de gelo. Foi feito o monitoramento destas soluções até metade do tempo de monitoramento ($\approx 1,5$ min), em seguida alíquotas da amostra (de 10 a 70 μ l, dependendo da concentração e atividade da enzima presente na amostra) foram adicionadas. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 min. Curvas de 3 a 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD nestas condições. Os valores da SOD ($U \text{ SODg}^{-1}$), expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade necessária para diminuir à metade a velocidade espontânea de formação do citocromo c^{++} (Flohé & Ötting, 1984).

4.6.2.2.4. Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx dismuta o t-BuOOH gerando uma ponte dissulfeto entre duas GSH (GSSG), que, por sua vez, volta ao estado reduzido (2GSH), pela ação da glutathione reductase (GR). A GR age mediante a oxidação de NADPH e assim, o ensaio é uma medida indireta que consiste em registrar a diminuição do NADPH. Para este ensaio, segundo Flohé & Gunzler (1984), utilizou-se amostra e ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH), 10 mM colocados em meio de reação composto de tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0, NADPH 1mM, ácido dietilenotriaminopentaacético(DPTA), 0,005 M e pH 7,0, água destilada, GSH 10 mM, e 5U de GR colocada momentos antes do ensaio. Este ensaio baseia-se na medida do decréscimo de absorbância (340 nm), promovido

durante a redução da GSSG, catalisada pela GR, em presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, em presença de t-BuOOH, catalisada pela GPx. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$.

4.6.2.3. Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas

4.6.2.3.1. Glutationa Reduzida

Para avaliar a concentração hepática de pequenos tióis em precipitado ácido, foi empregado o método de Beutler (1963). A adição de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB), nas cubetas de contendo tampão Tris-HCl 0,2 M e pH 8,0 e amostra, permite, após cerca de 3 minutos, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB), de cor amarela, mensurável em 412 nm. As concentrações obtidas neste ensaio foram expressas em mM.

4.6.2.3.2. Glutationa Total (GT) e Glutationa Oxidada (GSSG)

Para esta análise utilizou-se o método enzimático de Tietze (1969), onde a taxa de oxidação do NADPH usada na redução da GSSG, catalisada pela GR, permite avaliar indiretamente a concentração da glutathione total presente na amostra. As concentrações obtidas neste ensaio foram expressas em mM. Os valores de GSSG foram calculados em equivalentes ($2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG}$), a partir da concentração da glutathione total.

4.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE “IN VITRO” DA *Equisetum arvense*

4.7.1. Formação e monitoramento de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$):

A formação e monitoramento dos radicais hidroxila são determinados pelo método da deoxirribose de acordo com Halliwell & Gutteridge (1981). Este método baseia-se na oxidação da deoxirribose provocada por radicais hidroxila, produzidos pela reação do peróxido de hidrogênio com o ferro, levando a formação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), monitoradas espectrofotometricamente a 532 nm. Foi utilizada solução de cloreto de ferro (FeCl_3) e de ácido nitrilotriacético (NTA) para a formação de quelato (Nishida et al., 1991), tampão fosfato de potássio pH 7,4, deoxirribose, peróxido de hidrogênio e realizada uma incubação. Após o período de incubação, a reação é paralisada pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 2,8 %, seguida da adição de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% em NaOH 0,05 N. Após nova incubação, a absorbância das soluções é medida em 532 nm.

4.7.2. Formação e monitoramento dos radicais ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$):

Neste ensaio, o radical ânion superóxido é gerado através da reação catalisada pela enzima xantina oxidase que utiliza a xantina como substrato, levando à formação de radical ânion superóxido e ácido úrico. O monitoramento da produção deste radical é realizado espectrofotometricamente a 560 nm, pela redução do nitrobluetetrazolium (NBT). A atividade da xantina oxidase é avaliada pela medição colorimétrica da formação de ácido úrico a partir da xantina, a 295 nm (Robak & Gryglewski, 1988).

4.7.3. Análise Estatística

Todos os resultados obtidos nos testes biológicos foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA, complementado por Bartellett, adotando um nível mínimo de significância de $p < 0,05$; 0,01 e 0,001.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADOS BIOLÓGICOS

5.1.1. Avaliação da Citotoxicidade

Quando se trabalha com produtos naturais derivados de plantas, há necessidade de pré-avaliação da bioatividade dos extratos e frações obtidas, para um melhor direcionamento dos trabalhos de pesquisa (Siqueira et al., 1998). O teste de toxicidade aguda sobre a *Artemia salina* (TAS) tem sido muito utilizado para um rápido e relativamente simples monitoramento biológico, o qual se baseia apenas num parâmetro de morte ou vida; os dados são de fácil tratamento estatístico e permitem uma avaliação da toxicidade geral, sendo considerado essencial para uma avaliação preliminar do potencial biológico (Cavalcante et al., 2000).

Vários trabalhos tem correlacionado a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, anti-viral e antimicrobiana, parasiticida e tripanossomicida, (Siqueira et al., 1998). Alguns pesquisadores têm utilizado este bioensaio para avaliar extratos de plantas utilizadas como antitumorais; posteriormente, as frações ou compostos ativos são testados em culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação (McLaughlin, 1991).

Observando a tab. 2, nota-se que somente o extrato bruto da *E. arvense* e o extrato bruto e a fração AE da *M. chamaedrys* demonstraram uma LC_{50} abaixo de 1000 $\mu\text{g/ml}$, podendo, desta forma, ser considerados bioativos.

TABELA 2 - EFEITO DAS FRAÇÕES E EXTRATO BRUTO DA *E. arvense* E *M. chamaedrys* SOBRE *Artemia salina*.

Fração/Extrato	Concentração (mg/ml)	Mortalidade (%)	LC ₅₀ (µg/ml)
E. arvense			
Extrato Bruto	2,0	88,3	715,0 ± 215,0
	1,0	83,0	
	0,5	32,0	
Acetato de Etila (AE)	2,0	25,0	> 1000
	1,0	11,66	
	0,5	3,33	
M. chamaedrys			
Extrato Bruto	1,0	100	90,0 ± 45,0
	0,5	100	
Acetato de Etila (AE)	1,0	100	798,0 ± 121,0
	0,5	15,0	
Clorofórmio	1,0	23,6	> 1000
	0,5	3,0	
Sulfato de Quinidina	1,0		163,0 ± 153,0
	0,5		

5.2. RESULTADOS BIOQUÍMICOS

5.2.1. Análise do Potencial Antioxidante “in vivo”

O extrato bruto da *E. arvense* e as frações AE e BuOH da *M. chamaedrys* foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante, de acordo com o método descrito no procedimento experimental.

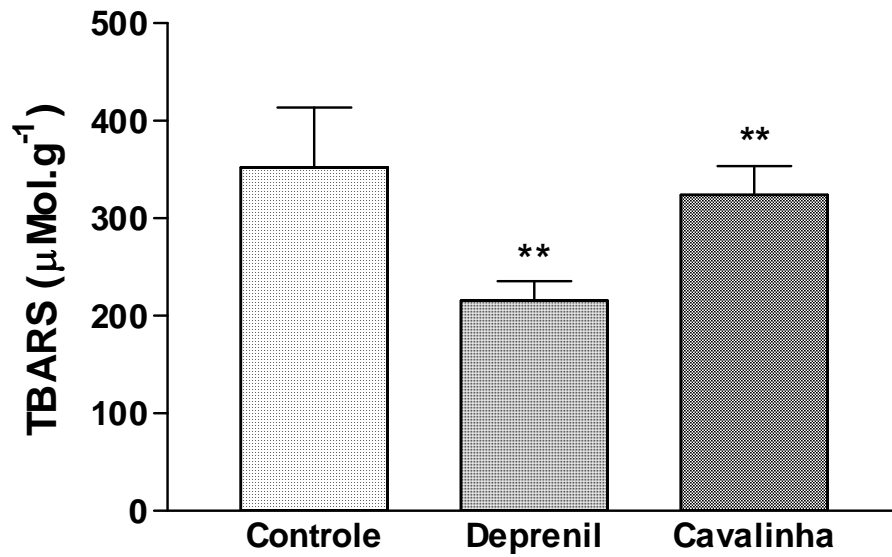
O dano celular, avaliado pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), apresentaram-se diminuídos para os grupos de animais tratados com os extratos e ou frações de ambas as plantas estudadas, quando comparados com os grupos controles (fig. 7). Desta forma, exerceram um efeito protetor sobre os tecidos cerebrais.

Os níveis de GSH (glutathiona reduzida) nos animais tratados com o extrato

bruto da *E. arvense* mostraram-se sensivelmente aumentados, se comparados com o grupo controle e o tratado com Deprenil (fig. 8). Como não houve modificação na atividade da GR (glutathione redutase) (fig. 11), pode-se supor que a elevação dos níveis da GSH não se deva à regeneração da glutathione oxidada (GSSG) pela GR e sim a um aumento na “síntese de novo” desta biomolécula. Como a atividade das enzimas citoprotetivas superóxido dismutase (SOD) e a da catalase (CAT), não sofreram modificações significativas (fig. 9 e 14), isto pode indicar que foram pouco requisitadas pelo sistema de defesa antioxidante, podendo-se deduzir que existam substâncias presentes capazes de “sequestrar” (*scavenger*) EROS. Já as enzimas GST (glutathione-S-transferase) e GPx (glutathione peroxidase) e os conteúdos de GT (glutathione total), não apresentaram alterações significantes em relação aos grupos controle e deprenil, corroborando a suposição anterior (fig. 12, 10 e 13).

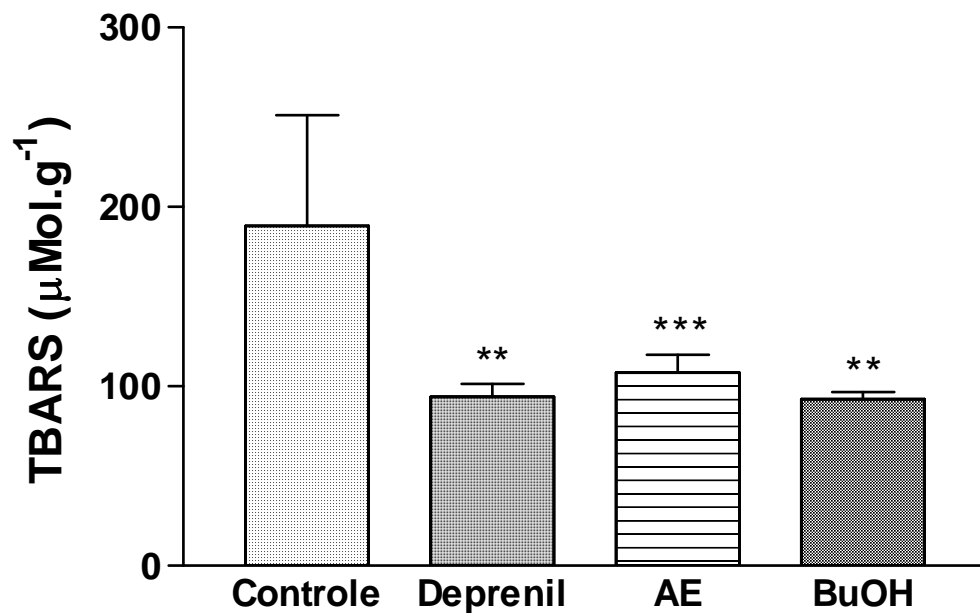
Os níveis de GSH dos grupos de animais tratados com as frações AE e BuOH da *M. chamaedrys* apresentaram-se reduzidos em relação ao controle e ao grupo tratado com Deprenil. Como a atividade da GPx dos grupos tratados com a fração BuOH mostrou-se bastante reduzida (fig. 10), poder-se-ia acreditar que a GPx estaria utilizando a GSH para converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. Porém, como a concentração da GT e a atividade da GR não tiveram modificações (fig. 11 e 13), poderia indicar que esta fração teria substâncias que poderiam estar de alguma forma alterando os níveis da glutathione oxidada (GSSG) e/ou da atividade da glutathione redutase (GR), não restaurando, então, os níveis de GSH. Já o grupo de animais tratados com a fração AE teve alteração sensível da atividade da GPx em relação aos outros grupos, podendo significar que esta fração contém substâncias capazes de estimular a síntese desta enzima e ou ter substâncias “scavenger”, visto que a atividade da SOD apresentou-se diminuída em relação ao controle (fig. 14) e a CAT (fig. 9) não se alterou, podendo-se, desta maneira, deduzir que estas enzimas não estariam sendo muito mais requisitadas pelo sistema de defesas anti-estresse oxidativo.

FIGURA 7 – CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM CÉREBRO DE RATOS CONTROLES E TRADOS COM DEPRENIL E EXTRATO BRUTO DA *E. arvense* (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BuOH DA *M. chamaedrys* (b)



(**) Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$)

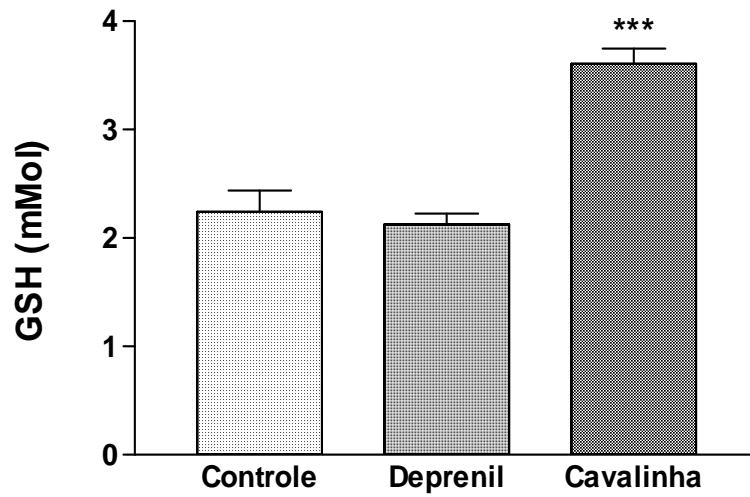
(a)



(*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (deprenil e BuOH $p < 0,01$ e AE $p < 0,001$)

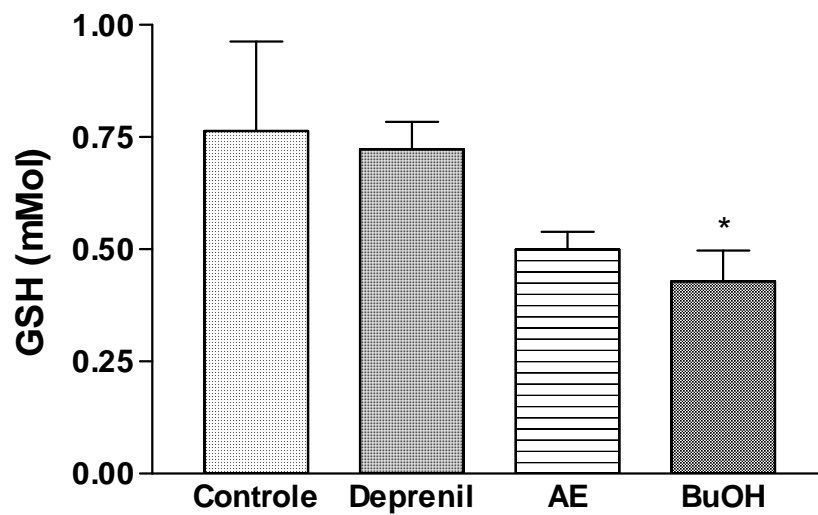
(b)

FIGURA 8 – CONCENTRAÇÃO DA GSH EM CÉREBRO DE RATOS TRATADOS COM DEPRENIL, CONTROLE E EXTRATO BRUTO DA *E. arvense* (a) E TRATADOS COM AS FRAÇÕES AE E BuOH DA *M. chamaedys* (b)



(*) Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$)

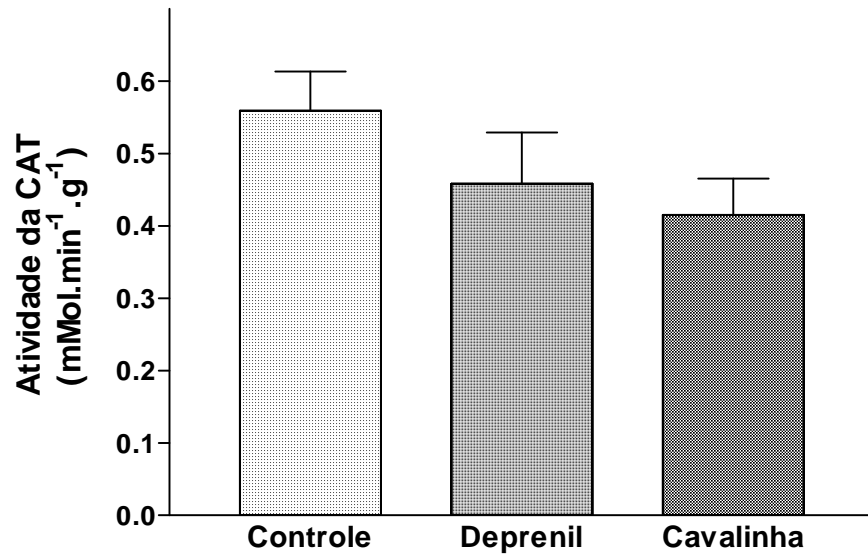
(a)



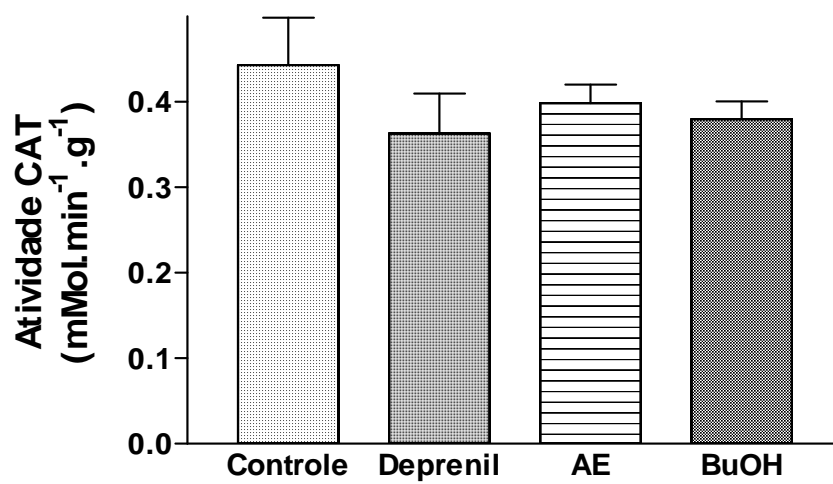
(*) Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

(b)

FIGURA 9 – ATIVIDADE DA CATALÁSE (CAT) EM CÉREBRO DE RATOS TRATADOS COM DEPRENIL, CONTROLE E EXTRATO BRUTO DA *E. arvense* (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BuOH DA *M. chamaedrys* (b)

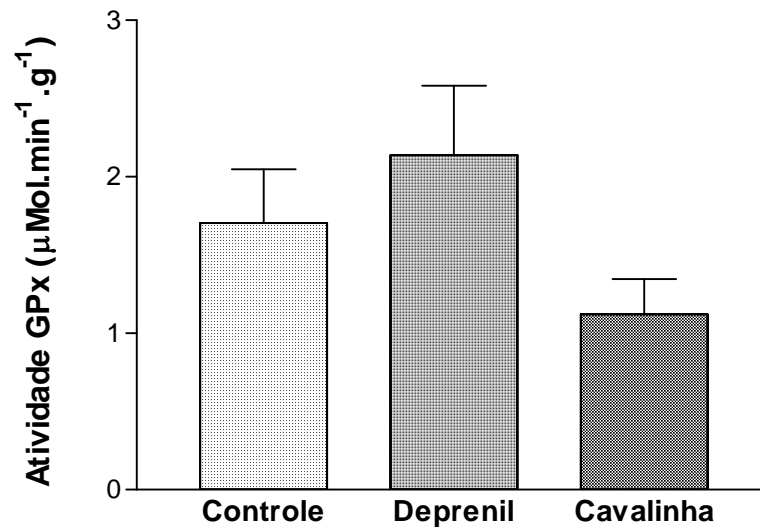


(a)

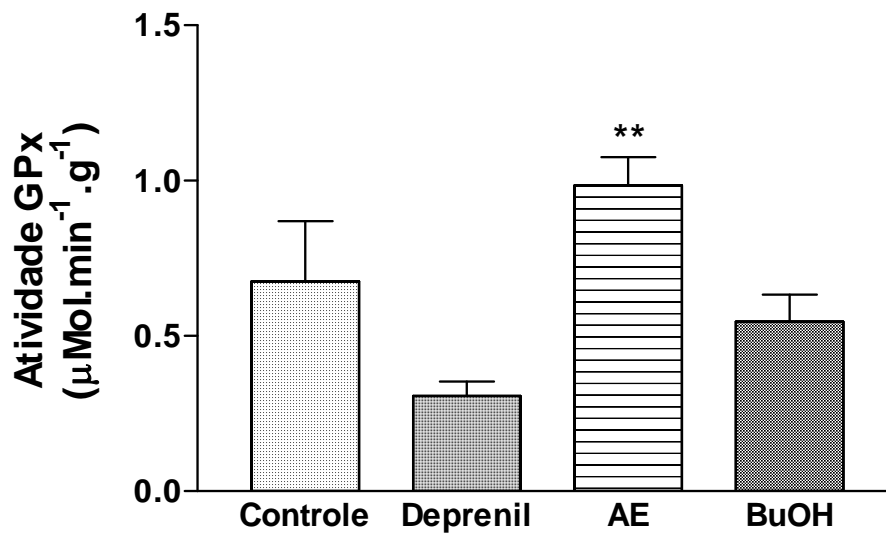


(b)

FIGURA 10 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) EM CÉREBRO DE RATOS TRATADOS COM DEPRENIL, CONTROLE E O EXTRATO BRUTO DA *E. arvense* (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BuOH DA *M. chamaedrys* (b)



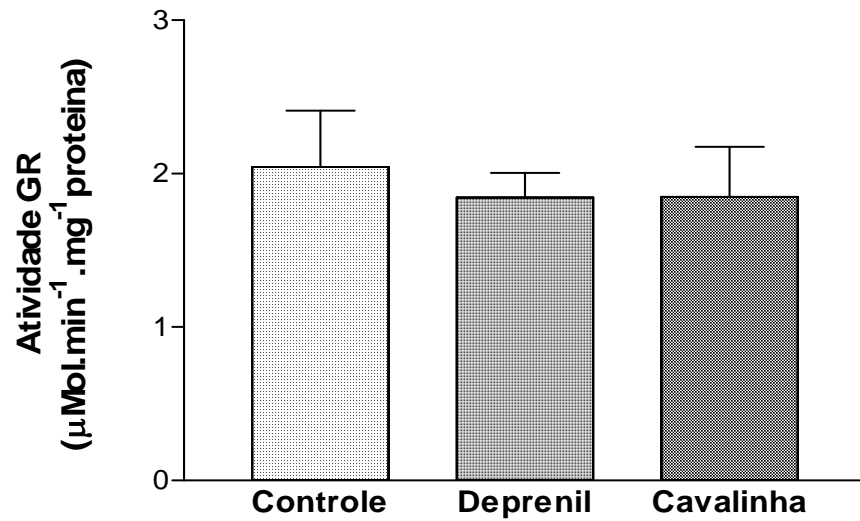
(a)



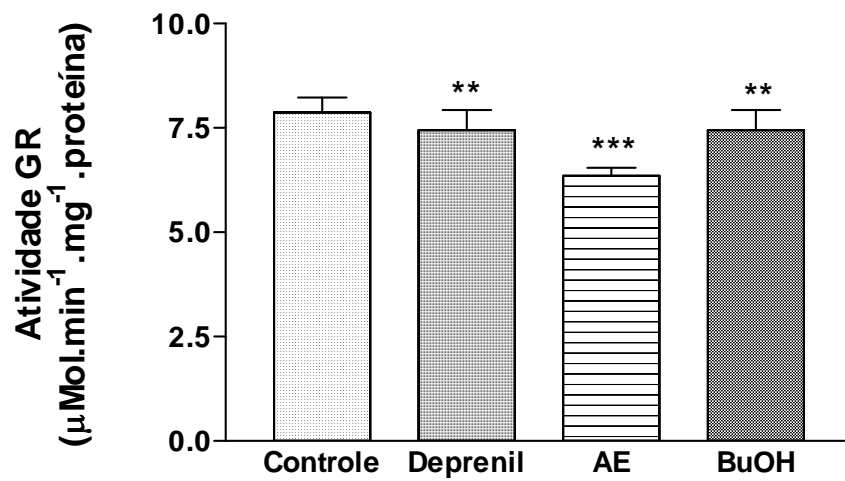
(*) Diferença significativa em relação ao grupo deprenil ($p < 0,01$)

(b)

FIGURA 11 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM CÉREBRO DE RATOS TRATADOS COM DEPRENIL, CONTROLE E EXTRATO BRUTO DA *E. arvense* (a) E COM AS FRAÇÕES AE E BuOH DA *M. chamaedrys* (b)



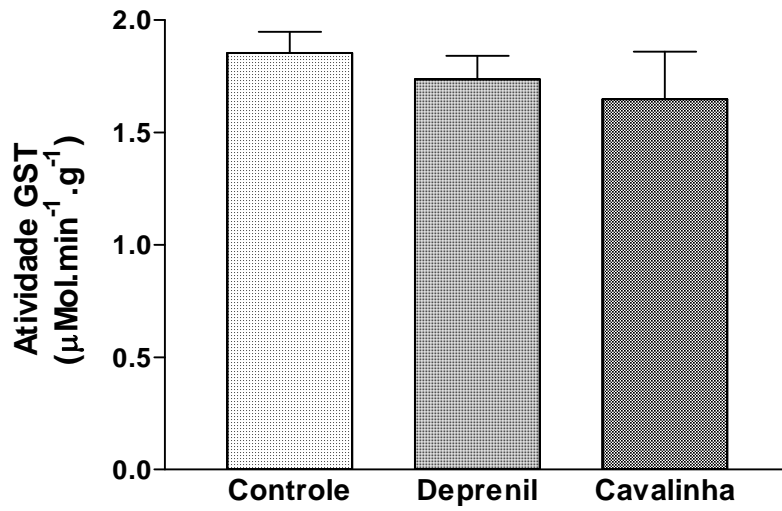
(a)



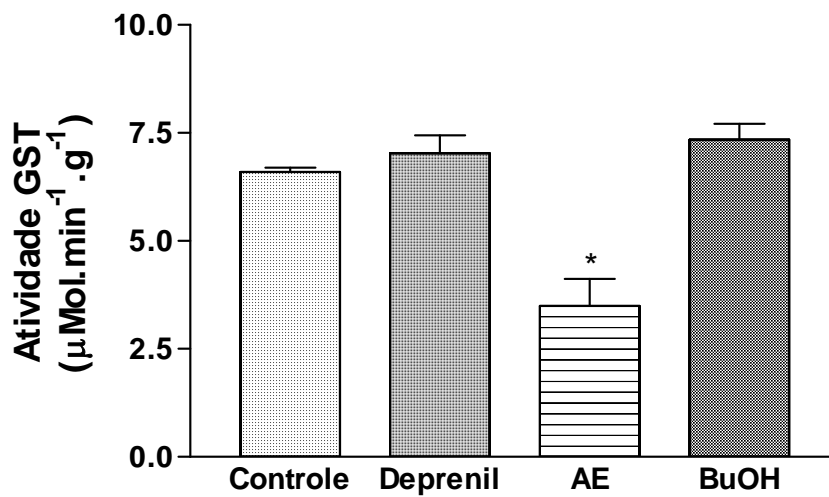
(*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (deprenil $p < 0,01$, AE $p < 0,001$ e BuOH $p < 0,01$)

(b)

FIGURA 12 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) EM CÉREBRO DE RATOS TRATADOS COM DEPRENIL, CONTROLE E O EXTRATO BRUTO DA *E. arvense* (a) E DAS FRAÇÕES AE E BuOH DA *M. chamaedrys* (b)



(a)



(*) Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$)

(b)

FIGURA 13 – CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL (GT) EM CÉREBRO DE RATOS TRATADOS COM DEPRENIL, CONTROLE E O EXTRATO BRUTO DA *E. arvense* (a) E DAS FRAÇÕES AE E BuOH DA *M. chamaedrys* (b)

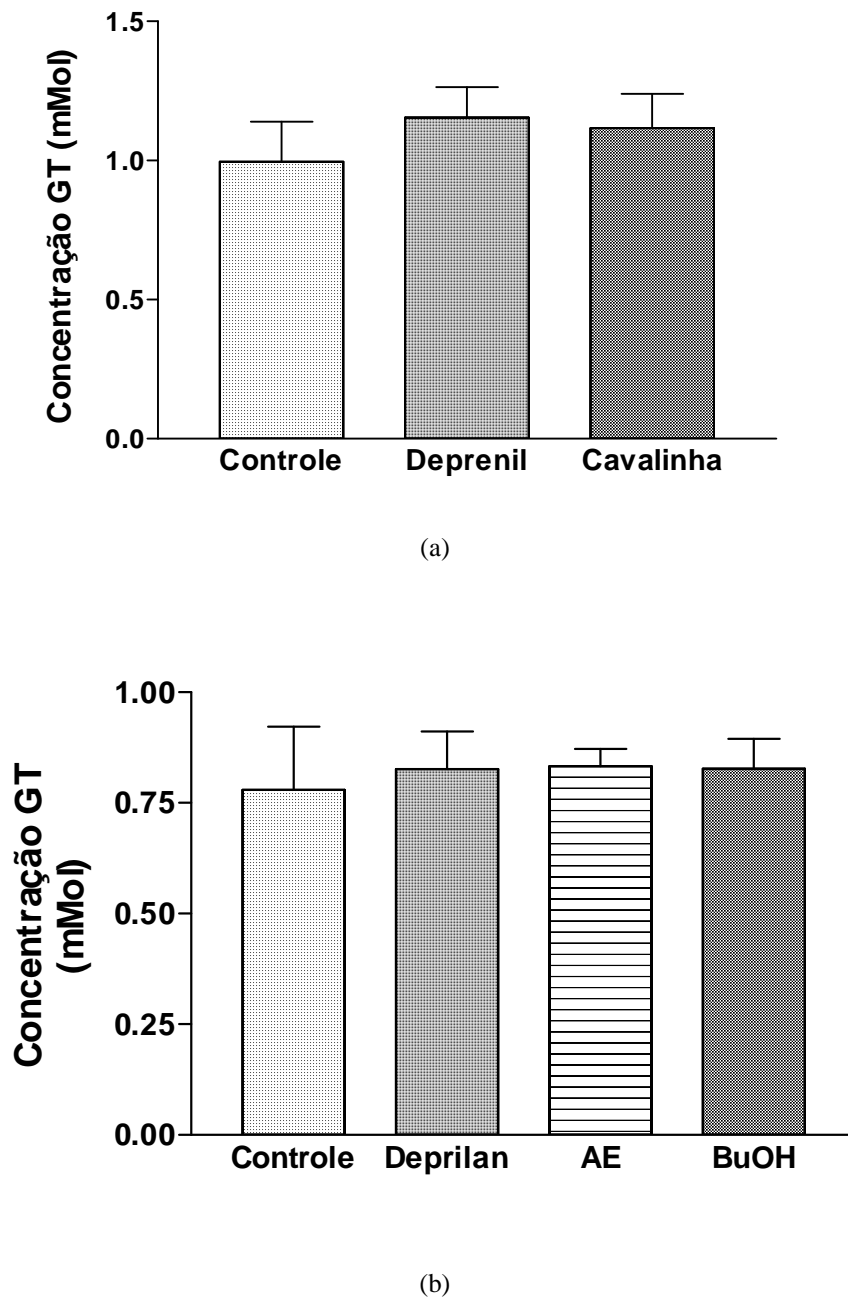
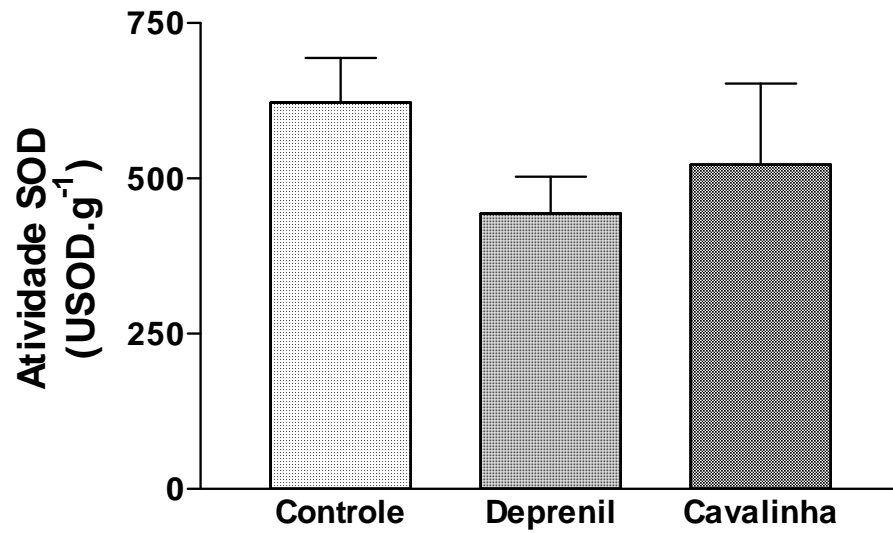
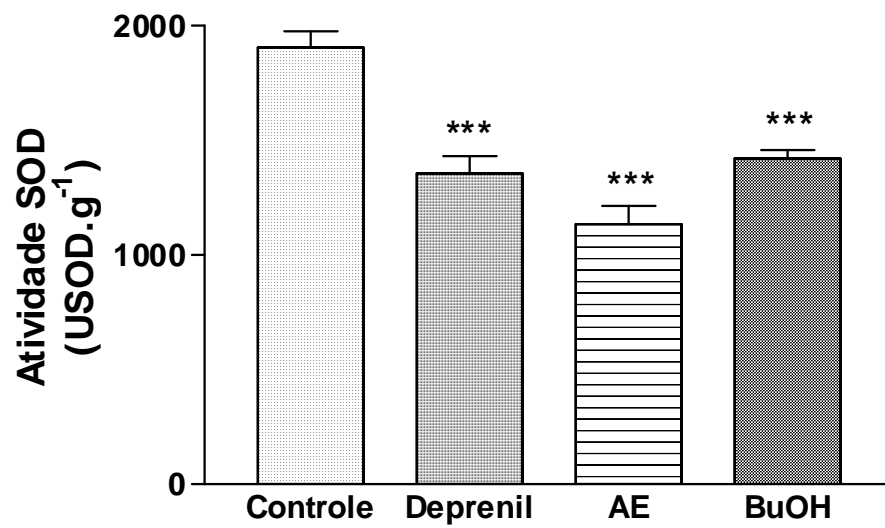


FIGURA 14 – ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO (SOD) EM CÉREBRO DE RATOS TRATADOS COM DEPRENIL, CONTROLE E O EXTRATO BRUTO DA *E. arvense* (a) E DAS FRAÇÕES AE E BUOH DA *M. chamaedrys* (b)



(a)



(*) Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$)

(b)

5.2.2. Análise Antioxidante “in vitro” do Extrato Bruto da *E. arvense*

A atividade antioxidante “in vitro” do extrato bruto da *E. arvense* foi testada pelo método de formação e monitoramento dos radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Os níveis de radical hidroxila foram medidos pela oxidação da desoxirribose provocada por estes EROs. Observando a tabela 3, pode-se perceber que o extrato bruto da *E. arvense* exerceu uma forte inibição da oxidação da desoxirribose tendo uma $\text{IC}_{50} = 7,00 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$, com erro experimental de 5%. O monitoramento da formação do ânion superóxido foi determinado pela redução do nitrobluetetrazolium (NBT). Através dos resultados obtidos, nota-se que o extrato bruto da *E. arvense* inibiu também a redução do NBT (tab. 4), com uma IC_{50} de $1,00 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$, com um erro experimental de 5%.

TABELA 3 – RESULTADOS DO MONITORAMENTO DOS RADICAIS HIDROXILA ($\bullet\text{OH}$) NO EXTRATO BRUTO DA *E. arvense*

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	A_{532}		% Oxidação da desoxirribose	% Proteção
	Amostras	Controle		
1	1.435	1.586	90.5	9.5
5	0.906	1.586	57.1	42.9
10	0.633	1.586	39.9	60.1
100	0.359	1.870	19.2	80.8
500	0.243	1.870	13.0	87.0
1000	0.213	1.870	11.9	88.6
1500	0.191	1.870	10.2	89.8

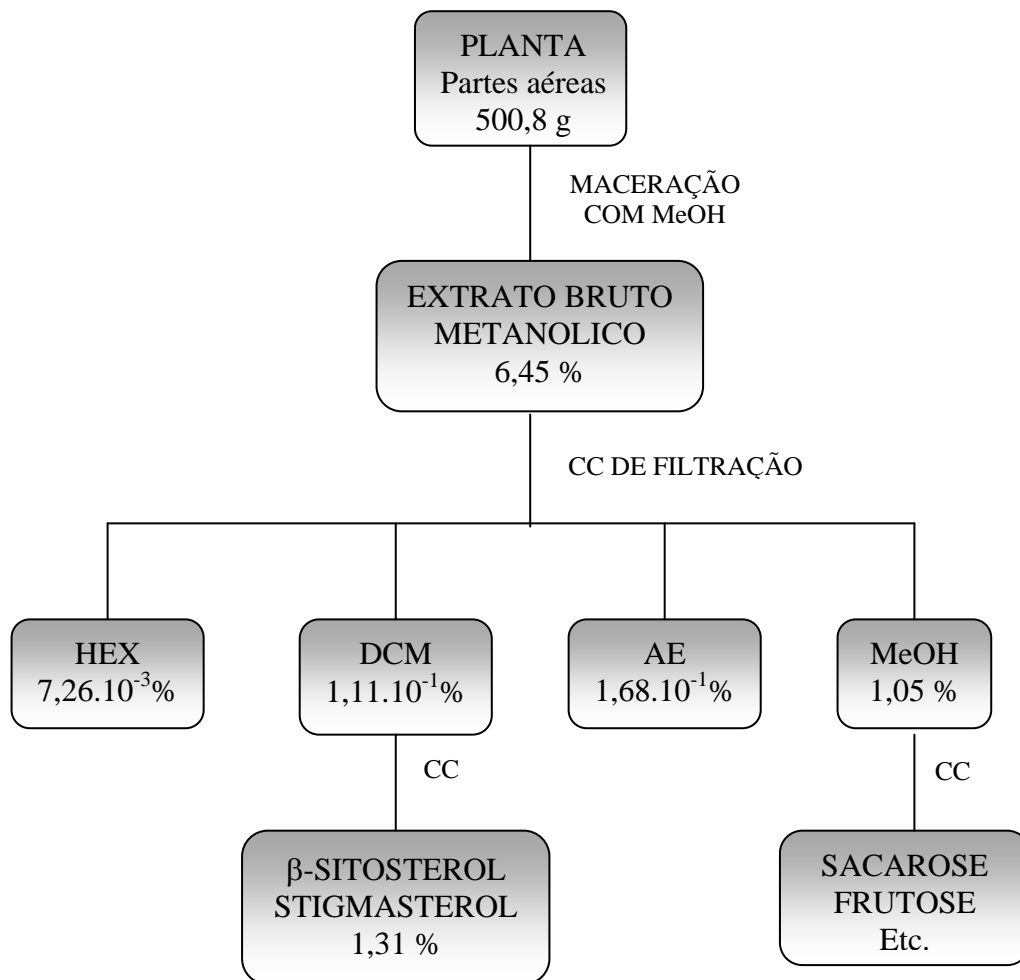
TABELA 4 – PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DO NTB DO EXTRATO BRUTO DA *E. arvense*

Concentração (mg/ml)	% de Redução do NBT
0	100
0.5	65
1.0	49
2.5	27
5.0	17

5.3. RESULTADOS FITOQUÍMICOS

5.3.1. *Equisetum arvense*

Para o isolamento dos compostos químicos da *E. arvense* foi obtido inicialmente o extrato bruto metanólico a partir de 500,8 g das partes aéreas secas e moídas (fig. 15), que forneceu um rendimento de 6,45 % de extrato seco por peso de material vegetal. O extrato bruto metanólico foi fracionado por CC com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, respectivamente, visando uma semi-purificação dos compostos pela diferença de polaridade. As frações de maior interesse foram a DCM (0,11 % de rendimento), que apresentou reação positiva com anisaldeído sulfúrico, sugerindo a presença de esteróis e terpenos; e a MeOH por seu maior rendimento (1,05%).

FIGURA 15 – ESQUEMA DE ANÁLISE FITOQUÍMICA DA *E. arvense*

5.3.1.1. Fração DCM

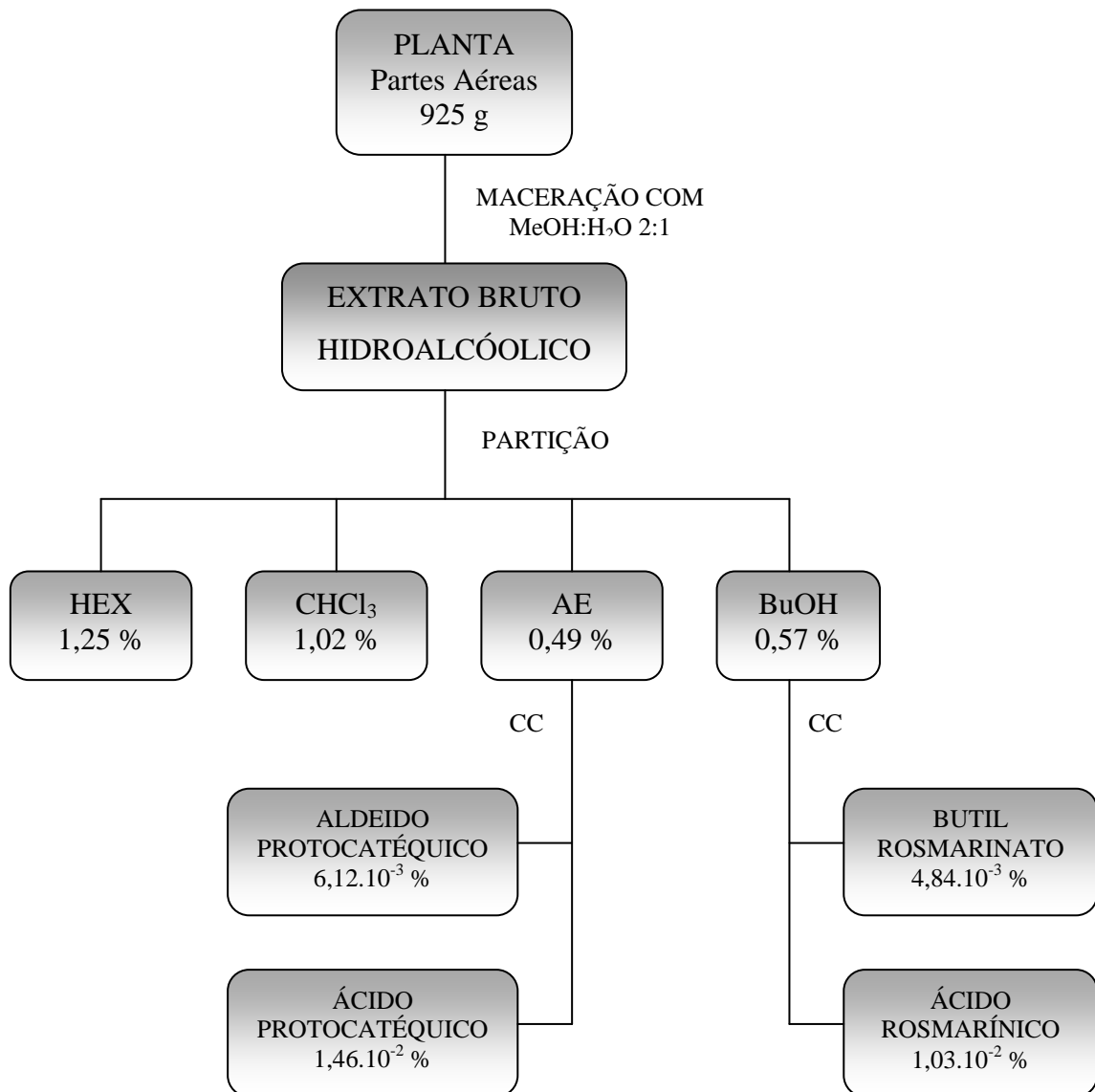
Esta fração foi cromatografada em coluna de sílica gel (ver procedimento experimental), obtendo-se um sólido branco (fr. 14-23), que, após análise por CCD e por IV, demonstrou ser uma mistura dos esteróis β -sitosterol e estigmasterol, cujos dados espectrais apresentaram-se semelhantes àqueles descritos na literatura (Niero, 1993). São considerados os mais abundantes fitoesteróis encontrados na natureza, sendo atribuído a eles um amplo raio de atividade farmacológica, dentre elas a atividade antiinflamatória (Mors et al., 2000), efeitos analgésicos (Santos et al., 1994; Cechinel Filho et al., 1996), ação antinoceptiva (Handa et al., 1992), e para tratamento de Hiperplasia Benigna de Próstata (Lowe & Ku, 1996).

5.3.1.2. Fração MeOH

A fração MeOH foi recromatografada por CC usando Sephadex LH 20, obtendo-se um composto de cor amarela (fr. 4), que apresentou uma única mancha por CCD; mas, após análise de IV e RMN ^1H , demonstrou ser uma mistura de açúcares comuns (sacarose, frutose, etc.).

5.3.2. *Marsypianthes chamaedrys*

Para analisar os componentes químicos da *M. chamaedrys*, foi preparado seu extrato bruto hidroalcolico com 925g das suas partes aéreas secas e moídas (fig. 16). O extrato assim obtido foi então particionado por extrações sucessivas com solventes de polaridades crescentes (ver procedimento experimental). Como as frações AE e BuOH apresentaram reação positiva no teste de bioatividade com *Artemia salina*, e tiveram reação positiva com cloreto férrico (FeCl_3), apresentando várias manchas escuras com R_f diferentes, sugerem a presença de compostos fenólicos (Ugaz, 1994), muito conhecidos na literatura por apresentar atividades contra vários tipos de câncer, atividade antioxidante, antifúngica e antibacteriana, entre outras (Ugaz, 1994; Phillipson, 2001; Rates, 2001). Por estas razões, estas frações foram selecionadas para o estudo químico e farmacológico.

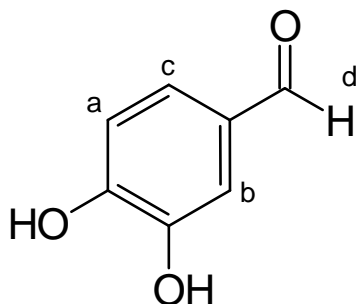
FIGURA 16 – ESQUEMA DE ANÁLISE FITOQUÍMICA DA *M. chamaedrys*

5.3.2.1. Fração AE

5.3.2.1.1. Fração 32-43

A fração AE 32-43 foi identificada como o aldeído protocatéquico (fig. 17) por análise de RMN¹ H, em cujo espectro pode-se observar os sinais referentes aos prótons do anel aromático em 7,0 ppm (a), 7,34 ppm (c), o sinal do próton b do anel em 7,36 ppm e o sinal referente ao próton d em 9,78 ppm (fig.18). Não existe nenhum dado na literatura relacionada à presença deste composto na *M. chamaedrys*.

FIGURA 17 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ALDEÍDO PROTOCATÉQUICO ISOLADO DA *M. chamaedrys*



5.3.2.1.2. Fração 54-68

A fração AE 54-68, que foi identificada como sendo o ácido protocatéquico (fig. 18), através de biblioteca de IV por comparação dos espectros com o da literatura (Pouchet, 1981). Neste espectro verifica-se a presença da banda larga de deformação axial de OH em 3452 cm⁻¹, banda de deformação axial de C–O em 1280 cm⁻¹ e bandas de deformação axial de C=C do anel aromático em 1656 cm⁻¹, 1514 cm⁻¹ e 1436 cm⁻¹

(fig. 20). Este composto foi isolado anteriormente da planta *Sebastiania schottiana* por Niero (2000) cujo espectro de RMN ^1H se encontra na figura 21, com o próton (a) em 6,92 ppm, o (b) em 7,49 ppm, o (c) em 7,51 ppm. Apesar de o ácido protocatéquico ser um composto característico das plantas da família *Lamiaceae*, não há relatos na literatura de sua presença na *M. chamaedrys*. O ácido protocatéquico é considerado como substância ativa de plantas que tem efeito contra veneno de cobras (Mors et al., 2000), e possui propriedade antioxidante, exercendo um efeito protetor no α -tocoferol em LDL humano (Zhang et al., 2001). Pode-se sugerir que este ácido é o responsável pela atividade antioxidante da fração AE, que apresentou baixos níveis de TBARS, exercendo um efeito protetor contra o dano celular. Os compostos polifenólicos, em geral, tem a capacidade de atuar como antioxidantes por um mecanismo “scavenger” (sequestrador) de radicais ERO, pela formação de radicais fenoxil menos reativos, ou pela habilidade de quelar metais de transição, sem complexar, suprimindo as reações de formação de ânions superóxido (reações de Fenton). Alguns estudos sugerem que esta atividade antioxidante de compostos fenólicos esteja relacionada com a facilidade de doar átomos de hidrogênio, “sequestrando” os ERO gerados durante a peroxidação lipídica.

FIGURA 18 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO PROTOCATÉQUICO ISOLADO DA *M. chamaedrys*

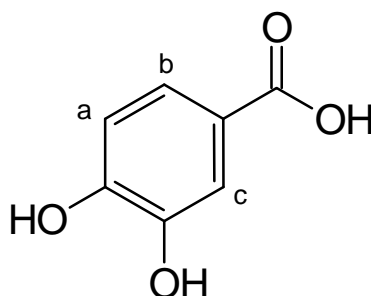


FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN ^1H (300 MHz, ACETONA) DO ALDEÍDO PROTOCATÉQUICO ISOLADO DA *M. chamaedrys*

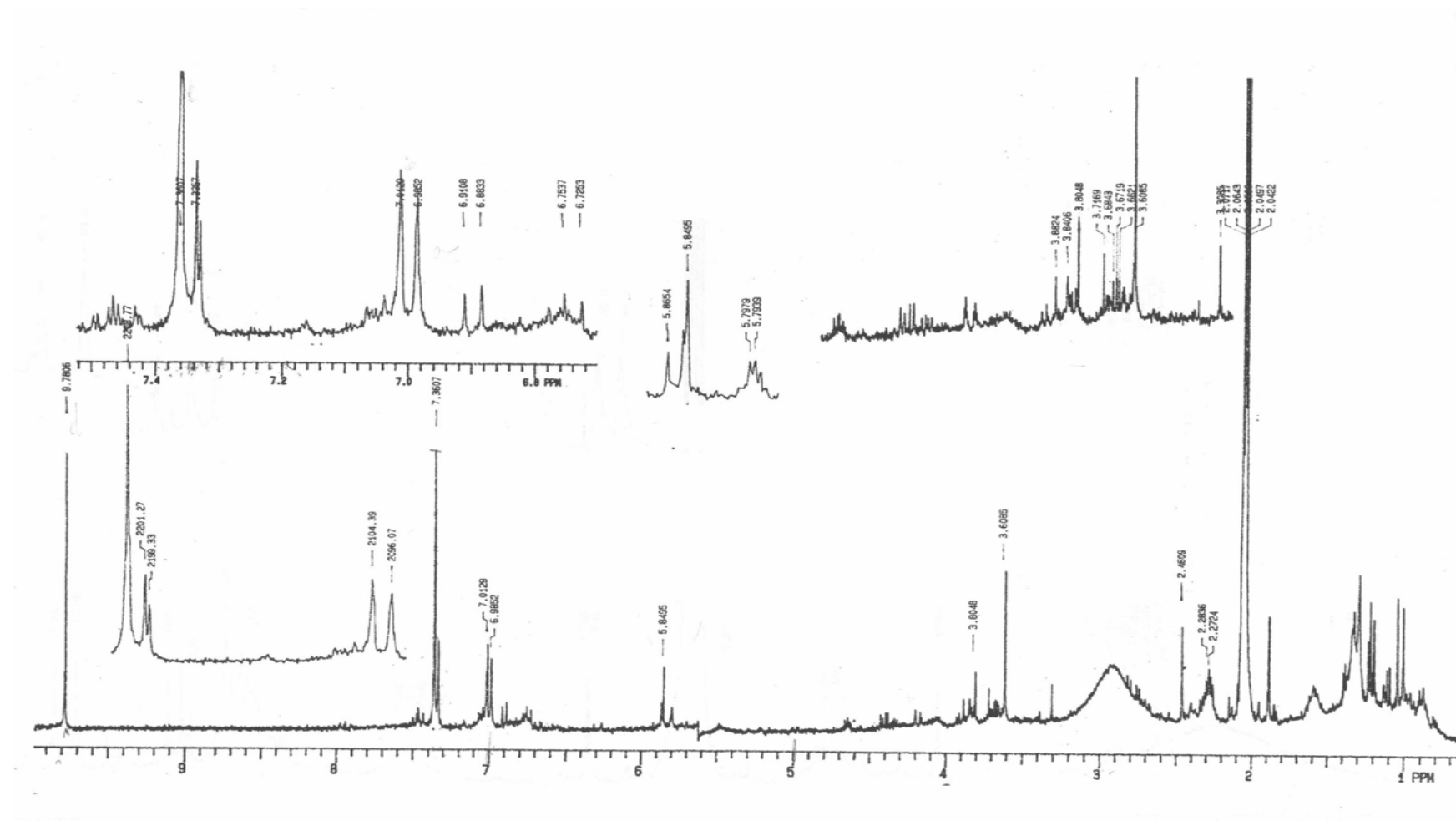
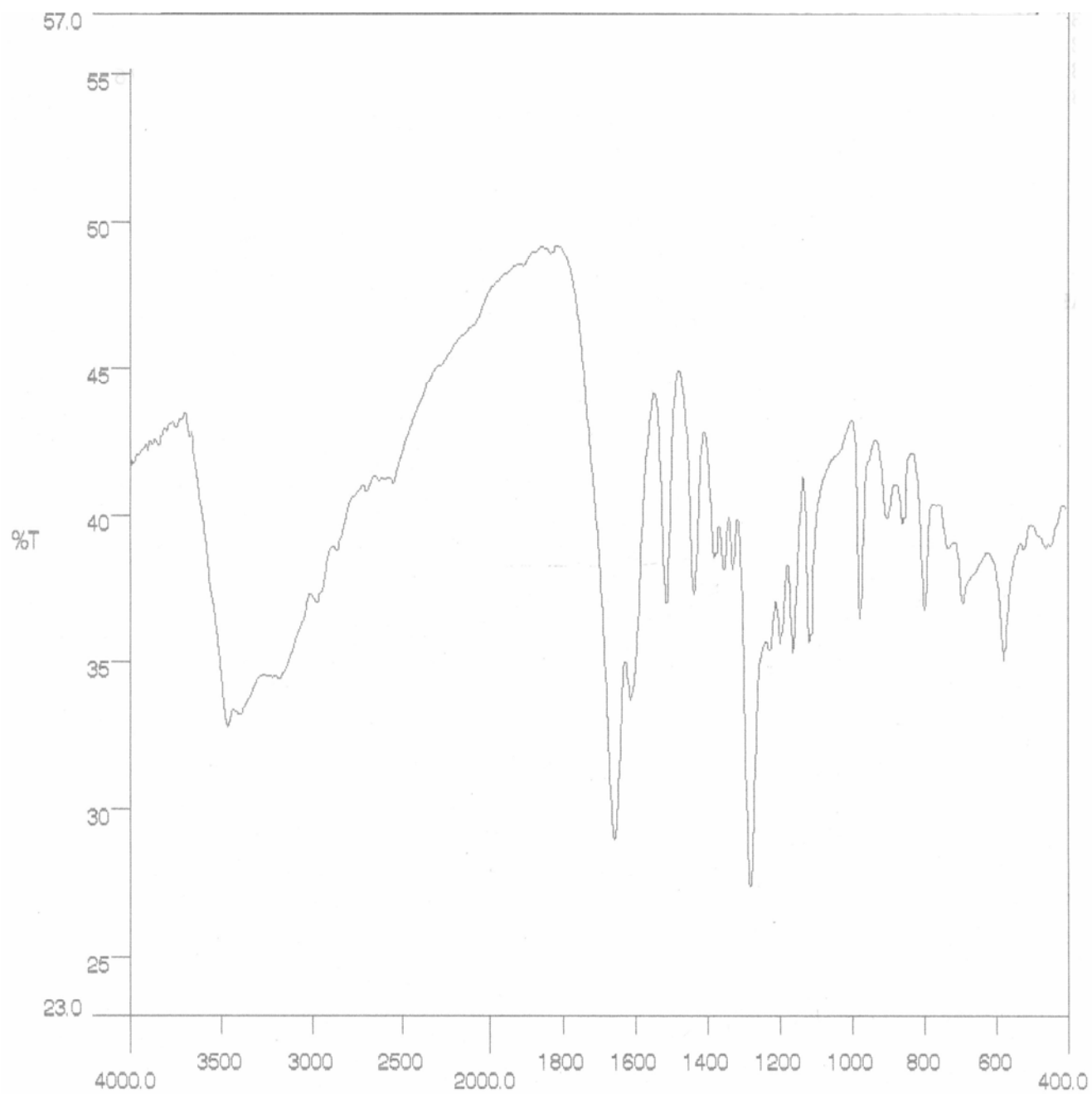
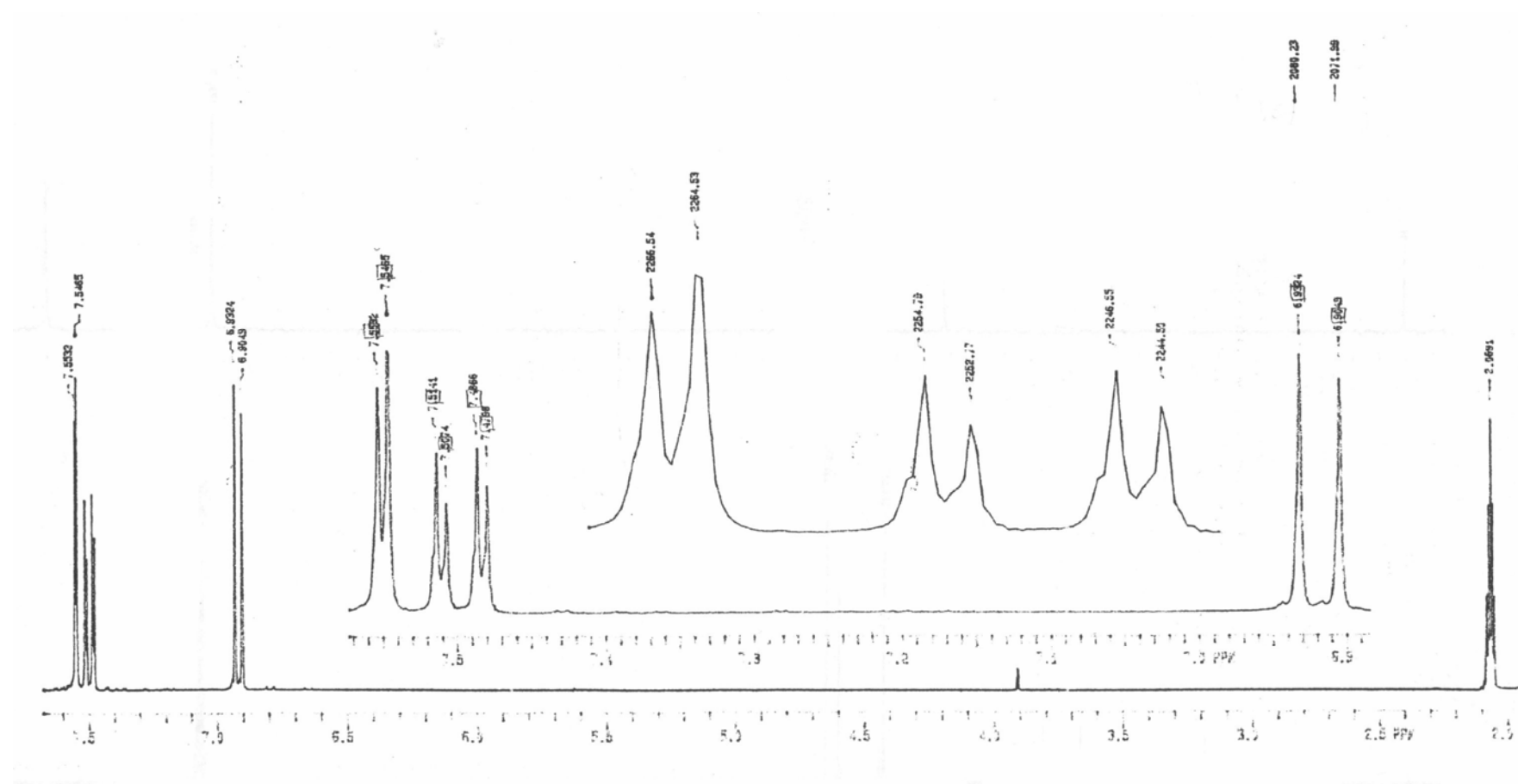


FIGURA 20 – ESPECTRO DE IV (PASTILHA DE KBr) DO ÁCIDO PROTOCATÉQUICO ISOLADO DA *M. chamaedrys*



60



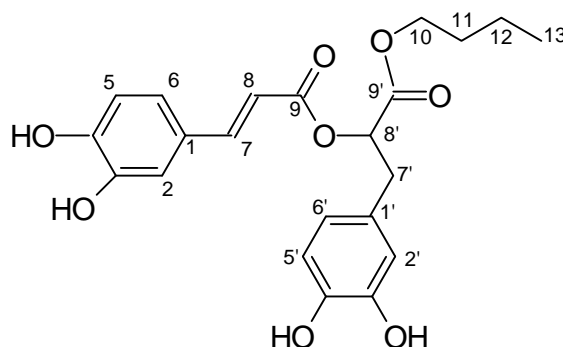
5.3.2.2. Fração BuOH

Esta fração foi cromatografada com sílica gel, conforme descrito no procedimento experimental, da qual foram obtidos dois compostos majoritários com bom grau de pureza, com cor amarelada (frações 6-13 e 30-38), que deram reação positiva com cloreto férrico (FeCl_3), indicando a presença de compostos fenólicos (Ugaz, 1994).

5.3.2.2.1. Fração 6-13

O composto obtido desta fração foi purificado por meio de cromatografia de exclusão com sephadex LH 20. Em seguida foi realizada a elucidação estrutural do composto purificado por análise espectrométrica de IV, RMN ^1H e ^{13}C , o qual foi identificado como o éster butil rosarinato (fig. 22), um derivado do ácido rosmarínico (identificado na fração BuOH 30-38). O espectro de IV apresentou uma banda intensa de carbonila ($\text{C}=\text{O}$) de ésteres em 1.714 cm^{-1} , uma banda larga característica de OH fenólicos na região de 3.382 cm^{-1} e banda de deformação axial de carbonos alifáticos em 2.930 cm^{-1} (fig. 23). Os dados dos sinais de RMN ^1H (fig. 24) e ^{13}C (fig. 25) encontram-se nas tabelas 5 e 6, os quais foram comparados ao ácido rosmarínico descrito na literatura (Lu & Foo, 1999). Não foi encontrado nenhum dado na literatura pesquisada a respeito do butil rosarinato, nem de sua presença nas plantas da família *Lamiaceae* ou da espécie *chamaedrys*.

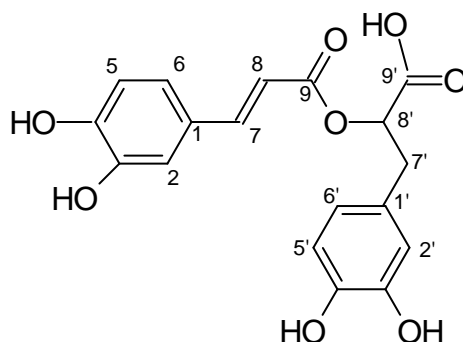
FIGURA 22 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO BUTIL ROSMARINATO ISOLADO DA *M. chamaedrys*



5.3.2.2.2. Fração 30-38

A fração BuOH 30-38 foi purificada pelo mesmo método utilizado na fração BuOH 6-13. A estrutura química deste composto foi identificada por análise de IV, RMN ^1H e ^{13}C , sendo reconhecido como o ácido rosmarínico (fig. 23). O espectro de IV deste composto apresentou banda larga e intensa em 3.410 cm^{-1} que é característica dos grupo OH ligado à carbonila de ácidos carboxílicos. Esta banda provavelmente está sobreposta à banda dos OH fenólicos que também absorvem nesta região. Apresentou banda característica de C=O de ácidos carboxílicos em 1.700 cm^{-1} e as duas bandas correspondentes aos estiramentos de C–O e deformação de OH em 1.280 e 1.380 cm^{-1} , respectivamente, e uma banda em 2.934 cm^{-1} característica do estiramento da ligação C–H do CH_2 (fig. 25). Os dados referentes aos espectros (figuras 26 e 27) de RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto isolado e do descrito na literatura (Lu & Foo, 1999) encontram-se nas tabelas 5 e 6.

O ácido rosmarínico é um composto bastante comum nas plantas da família *Lamiaceae* (Lu & Foo, 1999; Zgórk & Glowniak, 2001), porém não foi encontrado nenhum trabalho publicado relatando a presença deste ácido na espécie *M. chamaedrys*. O ácido rosmarínico é um derivado do ácido cafeico, considerado uma molécula biologicamente muito ativa. Ao ácido rosmarínico são atribuídas atividades antiviral, antibacteriana, antioxidante, antiinflamatória e ação imunoestimulante (Mors et al., 2000; Zgórk & Glowniak, 2001). A atividade antioxidante deste ácido está relacionada à propriedade de inibição da peroxidação lipídica (Lu & Foo, 1999). Esta atividade está associada à presença de hidrogênios fortemente acídicos, como sugerido para o ácido protocatéquico, facilitando a formação de fenoxil radicais que são menos reativos que as ERO, e pela capacidade de quelar metais de transição, atribuídas aos compostos fenólicos (Cotelle et al., 1996; Arora et al., 1998; Yesilada et al., 2000). Pode-se atribuir a atividade antioxidante “in vivo” da fração butanólica desta planta à presença do ácido rosmarínico e do butil rosmarinato.

FIGURA 23 – FÓRMULA ESTRUCTURAL DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DA *M. chamaedrys*TABELA 5 – DADOS DE RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DA LITERATURA*, DO BUTIL ROSMARINATO (FR. BuOH 6-13) E DO ÁCIDO ROSMARÍNICO (FR. BuOH 30-38) ISOLADOS DA *M. chamaedrys*

N ^o	Ác. Rosmarínico*	Fr. BuOH 6-13	Fr. BuOH 30-38
2	7,17 d	7,18 d	7,03 d
5	6,88 d	6,82 d	6,76 d
6	7,00 dd	7,07 dd	6,94 dd
7	7,53 d	7,56 d	7,52 d
8	6,34 d	6,32 d	6,27 d
2'	6,89 d	6,88 d	6,77 d
5'	6,75 d	6,75 d	6,68 d
6'	6,71 dd	6,65 dd	6,62 dd
7'	2,95 dd	3,52 dd	2,96 dd
	3,16 d	3,35 d	3,10 d
8'	5,07 d	5,17 d	5,09 d
10		4,076 t	
11		1,56 m	
12		1,32 m	
13		0,90 t	

*(Lu & Foo, 1999)

TABELA 6 – DADOS RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) DO ÁCIDO ROSMARÍNICO DA LITERATURA*, DO BUTIL ROSMARINATO (FR. BuOH 6-13) E DO ÁCIDO ROSMARÍNICO (FR. BuOH 30-38) ISOLADOS DA *M. chamaedrys*

Nº C	Ác. Rosmarínico*	Fr. BuOH 6-13	Fr. BuOH 30-38
1	129,5	127,6	127,8
2	117,3	115,2	115,2
3	143,4	146,8	144,9
4	145,6	146,8	146,0
5	118,5	116,3	116,3
6	124,1	121,9	121,8
7	148,5	149,9	149,5
8	117,0	115,2	115,1
9	171,4	169,6	168,9
1'	133,1	129,3	130,4
2'	119,6	117,9	117,6
3'	146,8	147,9	146,7
4'	147,5	149,3	147,5
5'	118,7	116,5	116,5
6'	125,2	123,2	123,0
7'	39,9	40,4	38,4
8'	79,9	77,9	76,5
9'	179,5	171,9	177,7
10		38,5	
11		65,6	
12		20,0	
13		14,0	

*(Lu & Foo, 1999)

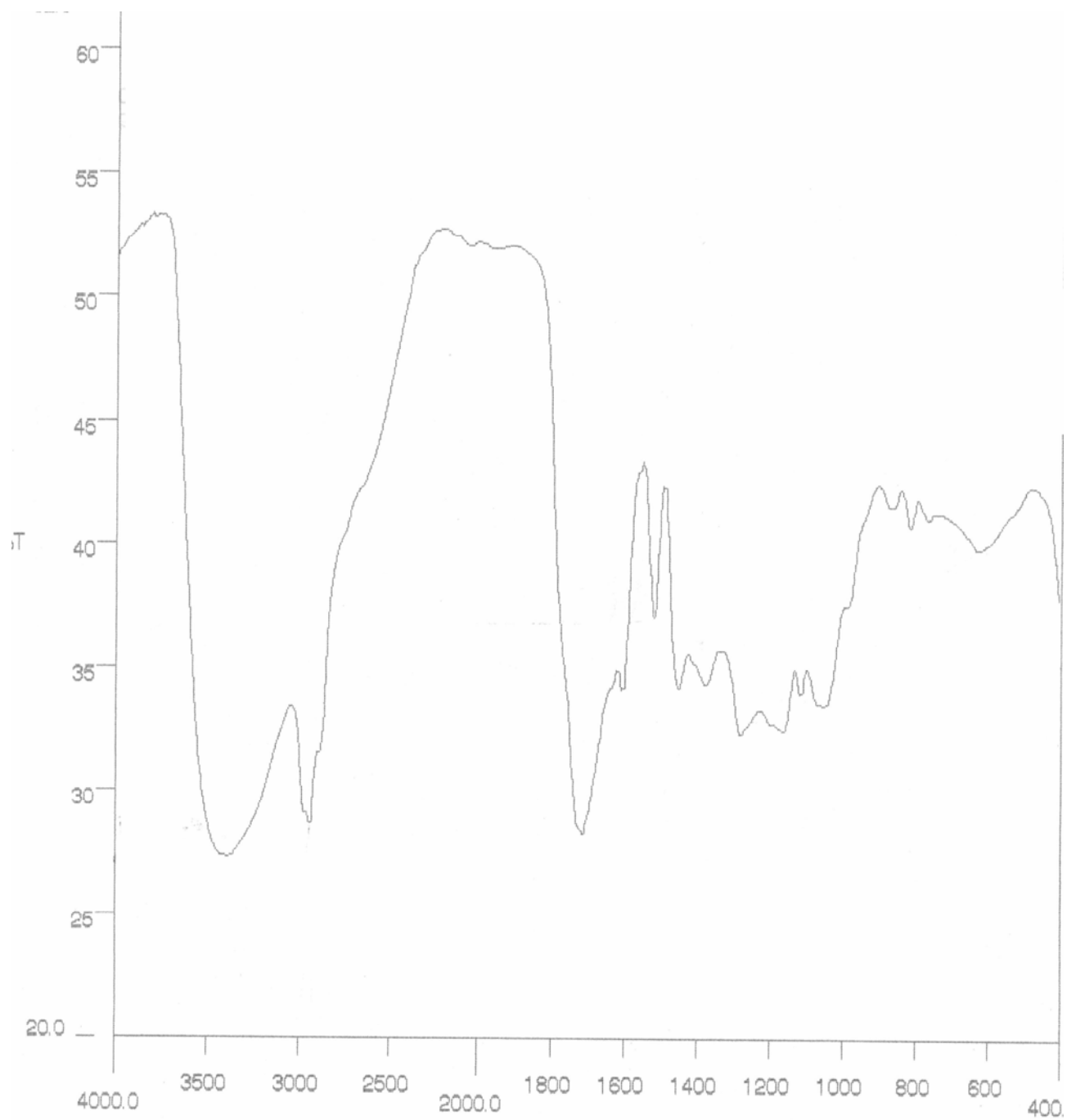
FIGURA 24 – ESPECTRO DE IV (PASTILHA DE KBr) DO BUTIL ROSMARINATO ISOLADO DA *M. chamedrys*

FIGURA 25 – ESPECTRO DE RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) DO BUTIL ROSMARINATO ISOLADO DA *M. chamaedr*

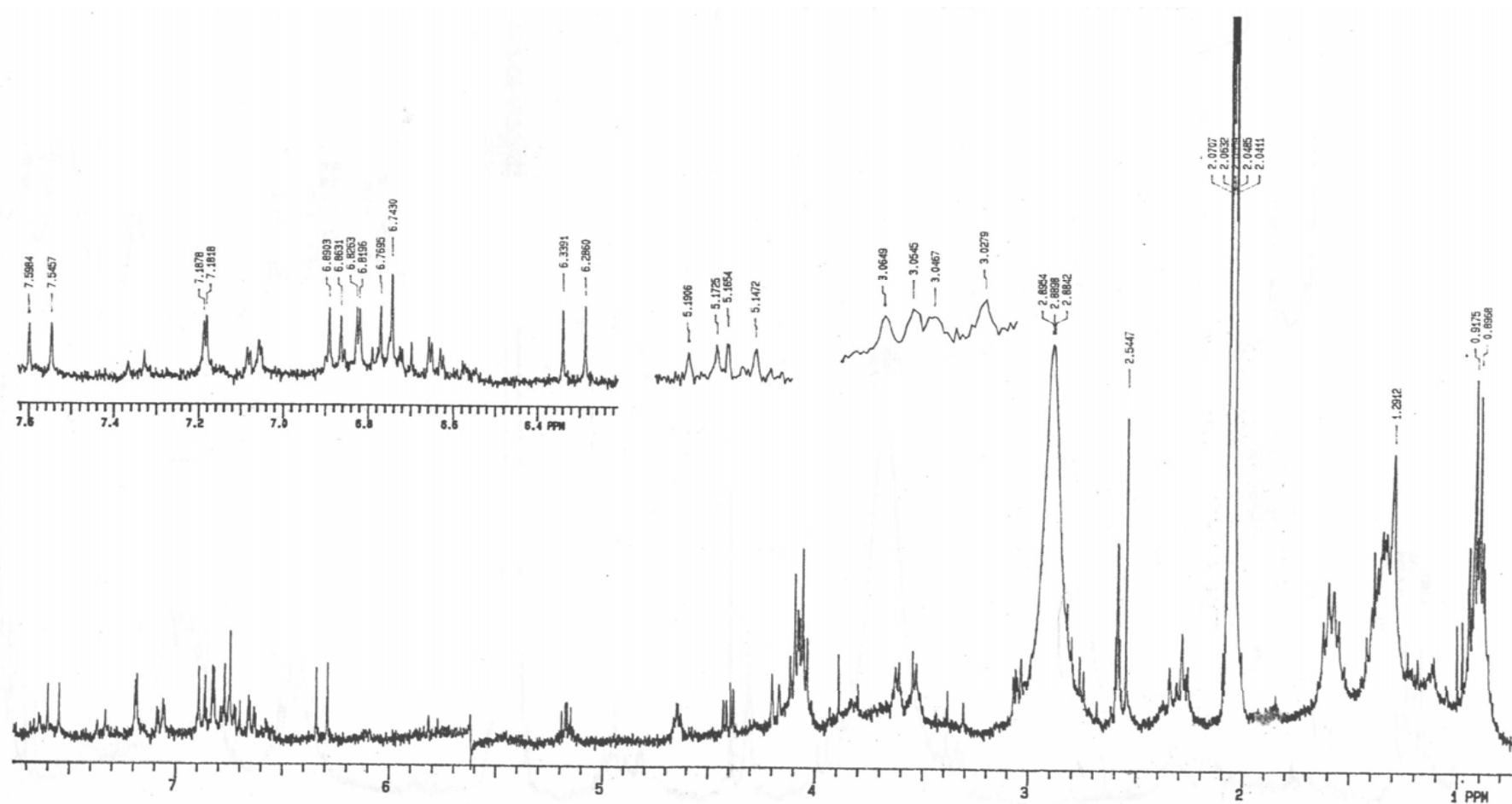


FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) DO BUTIL ROSMARINATO ISOLADO DA *M. chamaedrys*

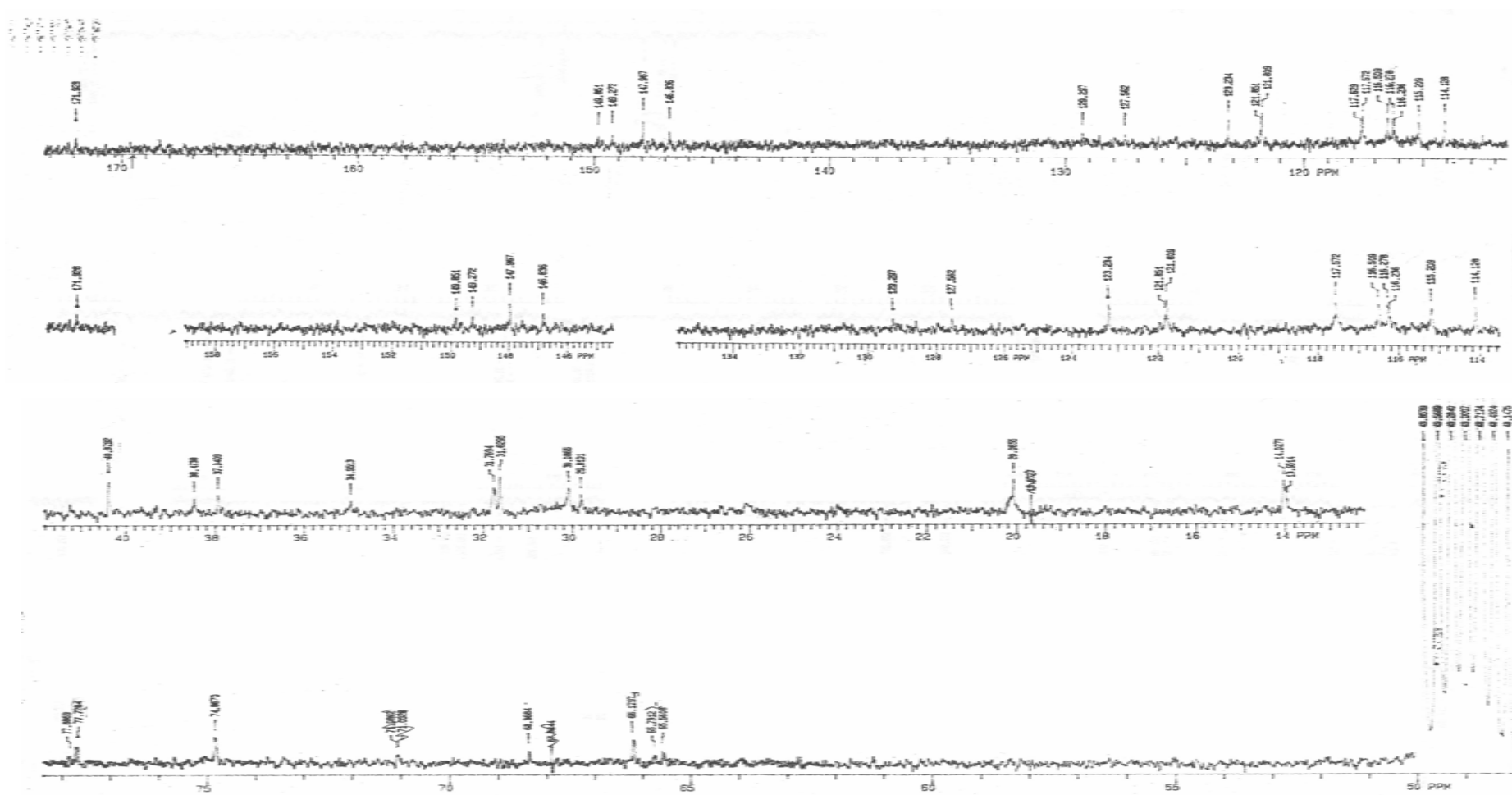


FIGURA 27 – ESPECTRO DE IV (PASTILHA DE KBr) DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DA *M. chamaedrys*

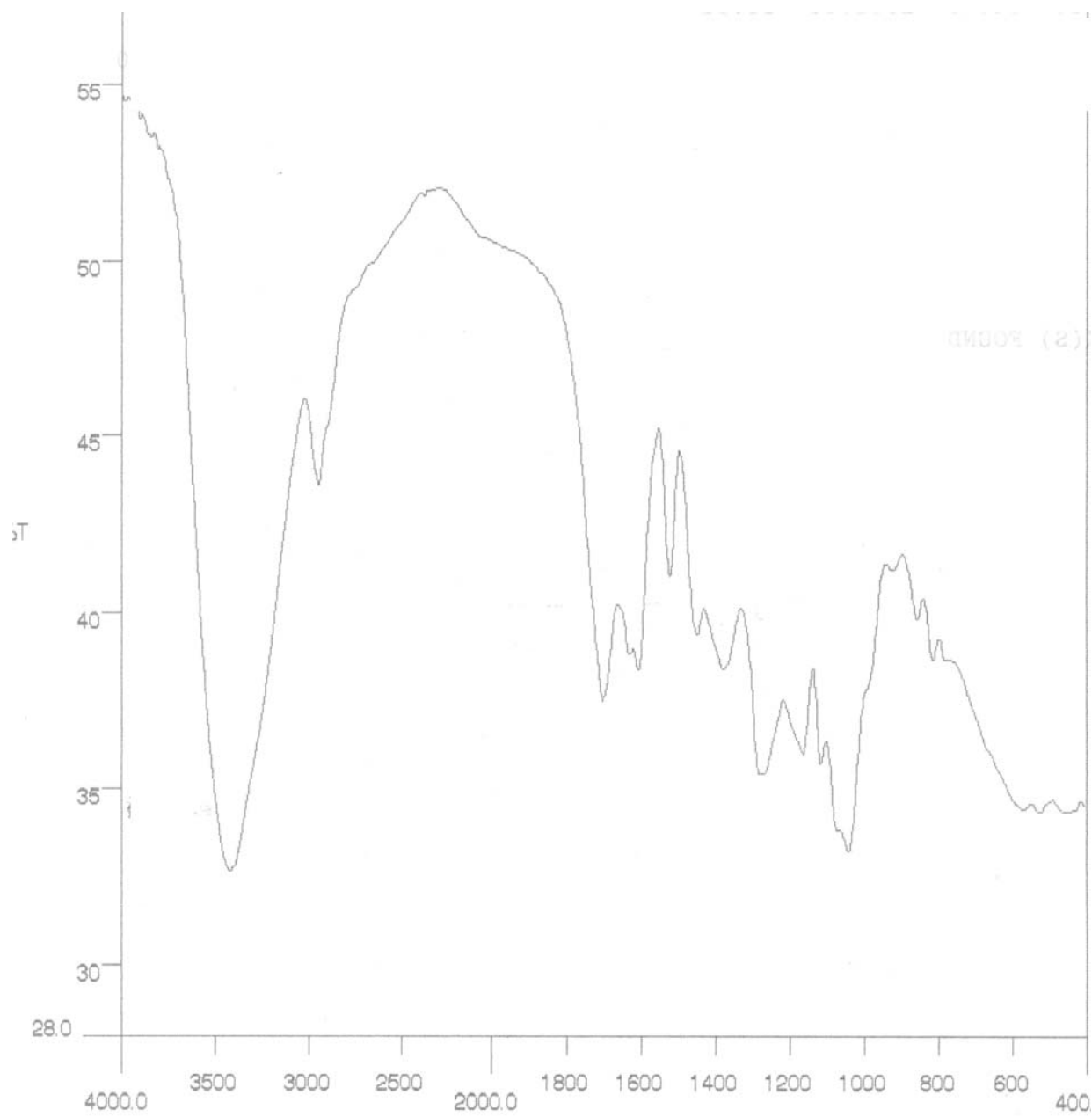


FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DA *M. chamaedrys*

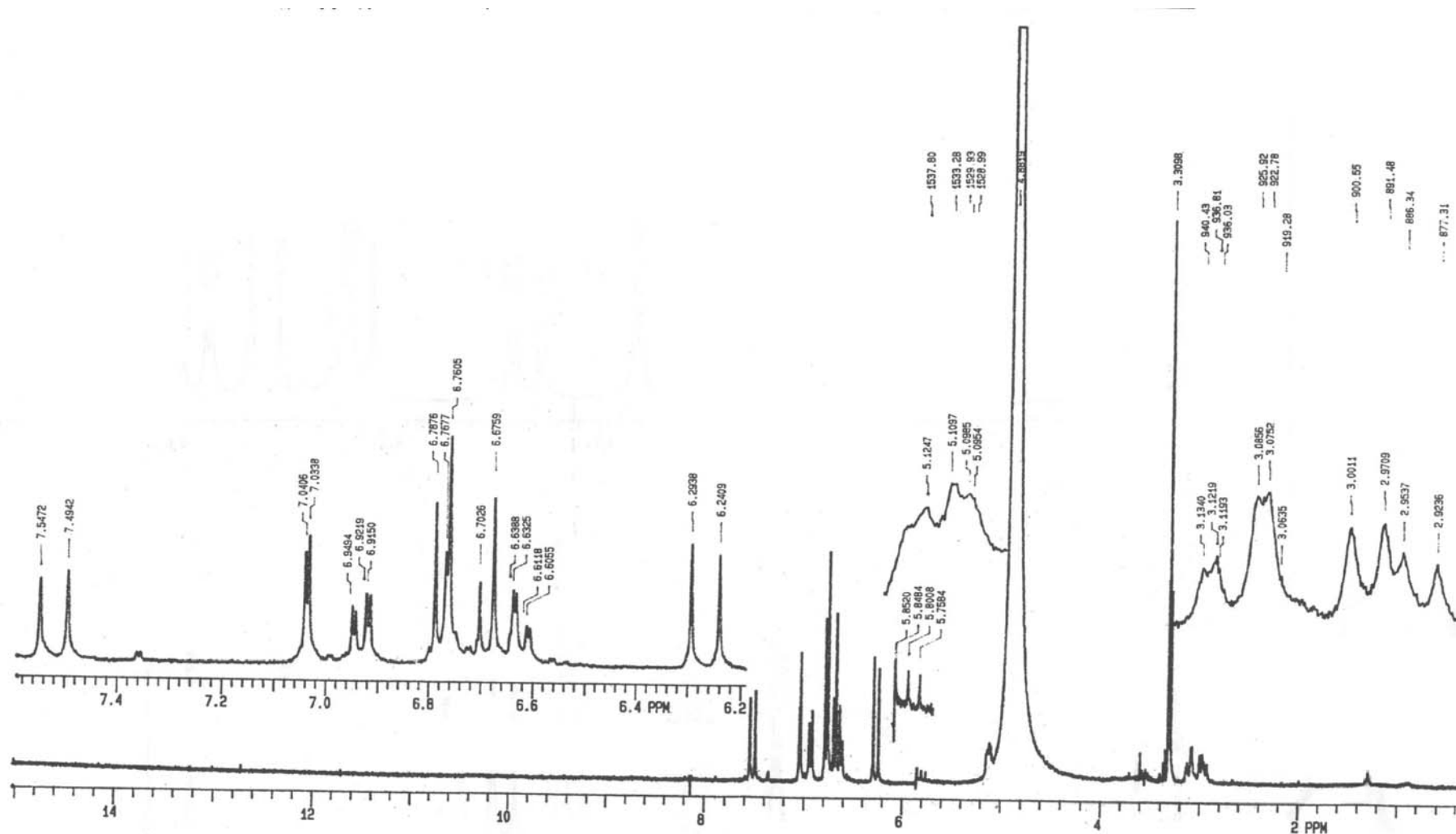
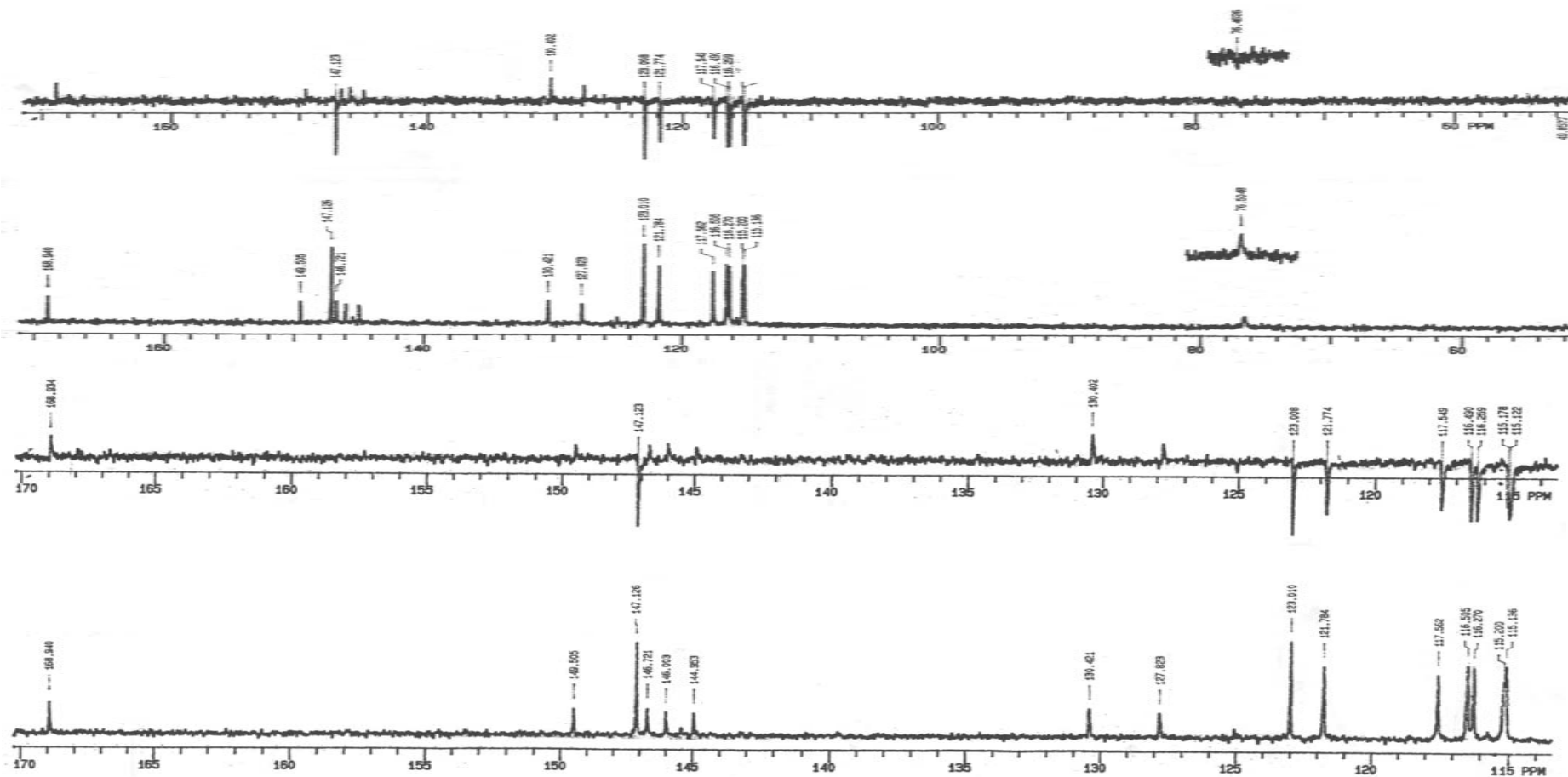


FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C E APT (DEPT) (75 MHz, CD_3OD) DO ÁCIDO ROSMARÍNICO ISOLADO DA *M. chamedrys*



6. CONCLUSÕES

Analisando os dados obtidos neste trabalho de pesquisa, pode-se concluir que:

1. O extrato bruto da *E. arvense*, bem como o extrato bruto e frações AE e BuOH da *M. chamaedrys*, apresentaram reação positiva ao teste de bioatividade com *A. salina*, sugerindo a presença de compostos bioativos;
2. Ambas plantas, extrato bruto da *E. arvense* e fração AE e BuOH da *M. chamaedrys*, exibiram capacidade antioxidante. Aspecto refletido na diminuição dos níveis de TBARS.
3. O extrato bruto obtido das partes aéreas da *E. arvense* foram ativos no modelo testado para antioxidante “in vivo”, podendo-se associar a presença de substâncias “scavenger” (seqüestradoras) dos radicais hidroxila e ânions superóxidos;
4. Embora a *E. arvense* tenha exibido um interessante perfil farmacológico, foram isolados apenas os esteróis β -sitosterol e stigmasterol da fração DCM devido à complexidade dos compostos presentes nesta planta;
5. O extrato bruto das partes aéreas da *M. chamaedrys* apresentou atividade no modelo testado para antioxidante “in vivo”;
6. Foram isolados e identificados quatro compostos fenólicos da *M. chamaedrys*: o ácido protocatéquico e o aldeído protocatéquico da fração AE e ácido rosmarínico e butil rosmarinato da BuOH, compostos estes descritos pela primeira vez na planta, e que podem ser os responsáveis pela ação antioxidante da mesma.
7. Os resultados obtidos, tanto com a *E. arvense* como a *M. chamaedrys*, sugerem a continuidade dos estudos visando elucidar melhor suas substâncias ativas.

8. As dose utilizadas, “in vivo”, “in vitro” e para estabelecer a LC_{50} estão aproximadamente dentro da mesma faixa, e dentro da faixa considerada fisiológica.

Diante dos promissores resultados farmacológicos da *Equisetum arvense*, que, além de apresentar atividade antioxidante, apresentou também atividades diurética e relacionada com a Hiperplasia Benigna de Próstata, e igualmente considerando os bons resultados químicos e farmacológicos obtidos com a *Marsypianthes chamaedrys*, sugere-se a continuidade das investigações. Particularmente, seria interessante a avaliação destes extratos em outros modelos farmacológicos e químicos, bem como a análise dos possíveis efeitos tóxicos relacionados com os mesmos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase “in vivo”. **Meth. Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in lipoxoma system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELL, Y. B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 61, p. 882-90, 1963.

BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Meth. Enzymol.**, v. 30, p. 105-10, 1984.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, v. 34, p. 707-17, 1973.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L. W., **Superoxide Dismutase**, CRC, Boca Raton. p. 159-68, v. 2, , 1982.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L.; MASSARO, D. **Oxygen, Gene Expression and Cellular Function**. Marcel Dekker: New York, 1997. v. 105, p. 1-25,.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. O. β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 62, p. 569, 1984.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, p. 558-565, 2000.

CAVALCANTE, F. M.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1, 3, 5 – triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Quim. Nova**, v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, A. R. S.; CAMPOS, R. O. P.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; FERRARI, F.; MESSANA, I.; CALIXTO, J. B. Chemical and pharmacological studies of *Phyllanthus caroliniensis*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 48, p. 1231-1236, 1996.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos ativos a partir de plantas medicinais: Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CEMTCHUJNICOV, J. D. **Manual de taxonomia vegetal: plantas de interesse econômico, agrícolas, ornamentais e medicinais**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976.

CETTO, A. A.; WIEDENFELD, H.; REVILLA, M. C.; SERGIO, I. A. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, p. 129-133, 2000.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** V. 59, p. 527-602, 1979.

CHRISTOPHERSEN, B. O. Formation of monohydroxy-polyenic fatty acids from lipid peroxides by glutathione peroxidase. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 176, p. 463-467, 1969.

COASSIM, M.; TOMASI, A.; VANNINI, V.; URSINE, F. Enzymatic recycling of oxidized ascorbate in pig heart: one-electron vs two-electron pathway. **Tech. Biochem. Biophys.**, v. 290, n. 2, p. 458-62, 1991.

COLLINS, C. H. et al. **Introdução a métodos cromatográficos**. Unicamp, 1993.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1585-1612, 1995.

CORREA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional 1984. v. 5.

COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; CATTEAN, J. P.; POMMERY, J.; WALLET, J. C.; GAYDOU, E. M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 1, p. 35-43, 1996.

D'AGOSTINO, M.; DINI, A.; SENATORE, F.; AQUINO, R. Sterols from *Equisetum arvense*. **Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.** v. LX, n. 12, 1984.

DE BEM, A. F. **Avaliação da expressão do citocromo P4501A1 hepático e das defesas antioxidantes em ratos tratados com Benzonidazol**. Florianópolis, 2001. (Dissertação de Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Fármaco, Medicamentos e Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

DE GROOT, H.; LITTANER, A. Hypoxia, reactive, oxygen and cell injury. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 6, p. 541-51, 1989.

FABER, J. L.; KYLE, M. E.; COLEMANN, J. B. Biology of disease mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab. Invest.** v. 62, p. 670-8, 1990.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Meth. Enzymol.**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. Superoxid dismutase assay. **Meth. Enzymol.**, v. 105, p. 93-104, 1984.

FORMAM, H. J.; LIIV, R. M.; TIAN, L. Glutathione cycling in oxidative stress. In: CLERCH, L. B. & MASSARO, D. J. (eds). **Oxygen, gene expression and cellular function**. New York: Marcel Dekker, p. 99-121, 1997.

FRANCO, I. J. **Ervas & Plantas. A medicina dos simples**. Chapecó – SC: Imprimax, 1997.

FRIDOVICH, I. Hypoxia and oxygen toxicity. In: FANH, S. et al., (ed). **Adv. Neurol.**, New York: Ravem, 1979. p. 225-6.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, **Adv. Enzymol.**, v. 58, p. 62-98, 1986.

GERSHMAN, R.; GILBERT, D. L.; NYE, S. W.; DWYER, P.; FENN, W. O. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, p. 623-6, 1954.

GUTIÉRREZ, M. P.; LAGUNA, G. Y.; WALKOWSKI, A. Diuretic activity of Mexican *Equisetum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 14, p. 269-272, 1985.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Formation of a thiobarbituric-acid – reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts – the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Lett.**, v. 128, n. 2, p. 347-352, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed. Oxford University Press, 1998.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HANDA, S. S.; CHAWLA, A. S.; SHARMA, A. K. Plants with antiinflammatory activity. **Fitoterapia**, V. 63, n. 1, p. 3-31, 1992.

HUXLEY, J. **Ensayos de un biólogo**. Buenos Aires: Editora Sudamericana, 1967.

JENKINS, R. R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidative stress, aging and exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 25, n. 2, p. 225-231, 1993.

JI, L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 5, p. 225-231, 1993.

JONES, D. P. The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: SIES, H. (ed) **Oxidative stress**. London: Academic Press, 1985. p. 151-95.

KAPPUS, H. A. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. **Chem. Phys. Lipids**, v. 45, p. 105-15, 1987.

KARLSSON, J. **Antioxidants and exercises**. Human Kinetics, USA, 1997.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JACOB, W. B. Mechanism for the several activities from glutathione S-transferase. **Biol. Chem.**, v. 251, p. 6183-8, 1974.

KELLING, P. L.; SMITH, L. L. Revelance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. **Biochem. Pharmacol.**, v. 31, p. 3243-49, 1982.

KENNEDY, T. A.; LIEBLER, D. C. Peroxil radical scavenging by beta carotene in lipid bilayers: effect of oxygen partial pressure. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 7, p. 4658-63, 1992.

KRINSKY, N. I.; DENEKE, S. M. Interaction of oxygen and oxyradicals with carotenoids. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 69, p. 205, 1982.

LEMUS, I.; GARCÍA, R.; ERAZO, S.; PEÑA, R.; PARADA, M.; FUENZALIDA, M. Diuretic activity of an *Equisetum bogotense* tea (Platero herb): evaluation in healthy volunteers. **J. Ethnopharmacol.**, v. 54, p. 55-58, 1996.

LITTLE, C.; O'BRIEN, P. J. An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** V. 31, p. 145-50, 1968.

LOWE, F. C.; KU, J. C. Phytotherapy in treatment of Benign Prostatic Hyperplasia: a critical review. **Urology**, v. 48, n. 1, p. 12-20, 1996.

LU, Y.; FOO, L.Y. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 263-7, 2000.

LUGASI, A. Potentially health – protective effects of flavonoids having food origin. **Orvosi Hírlap**, v. 141, p. 1751-1760, 2000.

MARGARITIS, I. No evidence of oxidative stress after triathlon race in highly trained competitors. **Int. J. Sports Med.**, v. 18, n. 3, p. 186-90, 1997.

MARSHAL, W. J.; BANGERT, S. K. **Clinical Biochemistry: metabolic and clinical aspects**. 1^a ed. New York, NY: Churchill Livingstone, 1995.

MAY, J.; MENDIRATA, S.; HILL, K. E.; BURK, R. F. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by selenoenzyme thioredoxin reductase. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 36, p. 22607-10, 1997.

Mc CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6049-55, 1969.

Mc LAUGHLIN, J. L. In: **Methods in plant biochemistry**, Ed. Hostettmann K., Academic Press, London, 1991. v. 6 p. 1-32.

Mc LAUGHLIN, J. L.; CHANG, C-J.; SMITH, D. L.; In: KINGHORN, A. D. & BALANDRIM, M. F **Human Medicinal Agents from Plants**, (eds) Symposium Series, , Americam Chemical Society, Washington, D. C. 1993. n. 534p. 112-137.

MENDIRATTA, S.; QU, Z. C.; MAY, J. Enzyme dependent ascorbate recycling in human erythrocytes: role of thioredoxim reductase. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 25, n. 2, 221-8, 1998a.

MENDIRATTA, S.; QU, Z. C.; MAY, J. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 5, p. 221-8, 1998 b.

MENEZES, F. S.; BORSATTO, A. S.; PEREIRA, N. A.; MATOS, F. J. A.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from *Marsypianthes chamaedrys*. **An. Acad. Bras. Ci.**, v. 70, n. 4, p. 7616, 1998a.

MENEZES, F. S.; BORSATTO, A. S.; PEREIRA, N. A.; MATOS, F. J. A.; KAPLAN, M. A. C. Chamaedrydiol, a new ursane triterpene from *Marsypianthes chamaedrys*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 2, p. 323-5, 1998b.

MENEZES, F. S.; SILVA, C. S.; PEREIRA, N. A.; MATOS, F. J. A.; BORSATTO, A. S.; KAPLAN, M. A. C. Molluscidal constituents of *Marsypianthes chamaedrys*. **Phyt. Res.**, v. 13, p.433-435, 1999.

MITICH, L. W. Horsetail. **Weed Technology**, v. 6, n. 3, p. 779-781, 1992.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite-the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-642, 2000.

NAKAMURA, H.; HUKUTI, G. In: SALEH, N. A. M.; TOWERS, G. H. N. Flavonoids of *Equisetum* species. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1095-1099, 1972.

NIERO, R. **Isolamento e identificação de compostos da *Phyllanthus corcovadensis* (Euphorbiaceae) com efeito analgésico, correlação estrutura atividade**. Florianópolis, 1993. (Dissertação de Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

NIERO, R. **Obtenção de novas moléculas com atividade analgésica e antiinflamatória a partir de plantas medicinais brasileiras**. Florianópolis, 2000. (Tese de Doutorado). Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

NISHIDA, Y.; YOSHIKAWA, K.; AKAMATSU, T. Preparation of iron (III) complex with nitrilotriacetic acid and origin of its unique reactivity. **Chem. Lett.**, v. 9, p. 1521-1524, 1991.

PALLOZA, P.; MOULLA, S.; KRINSKY, N. I. Effects of beta carotene and alpha tocopherol on radical initiated peroxidation of microsomes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 13, n. 2, p. 127-36, 1992.

PAOLISSO, G.; TAGLIAMONTE, M. R.; RIZZO, M. R.; MANZELLA, D.; GAMBARDELLA, A.; VARRICCHIO, M. Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. **Amer. Geriatrics Soc.**, v. 46, p. 833-8, 1998.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

POUCHET, C. J. **The Aldrich Library of Infrared Spectra**. 3rd ed. Milwaukee: Aldrich Chemical, 1981.

POUCHET, C. J. **The Aldrich Library of NMR Spectra**. 2nd ed. Milwaukee: Aldrich Chemical, 1983.

PRYOR, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Amer. Rev. Physiol.**, v. 48, p. 657-667, 1986.

POTTERAT, O. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. **Current Organic Chemistry**, v. 1, p. 415-440, 1997.

PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. **Free Radicals. A functional Approach**. Oxford: IRL Press, 1996.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicom**, v. 39, p. 603-613, 2001.

ROBACK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, p. 837-841, 1988.

ROSE, R. C. Solubility properties of reduced and oxidized ascorbate as determinants of membrane permeation. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 924, n. 1, p. 254-256, 1987.

SAINT-CRICQ DE GAULEJAC; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 425-431, 1999.

SALEH, N. A. M.; NAJAK, W.; TOWERS, G. H. N. Flavonoids of *Equisetum* species. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1095-1099, 1972.

SANTOS, A. R. S.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R.; VIANA, A. M.; MORENO, F. N.; CAMPOS, M. M.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Analgesic effects of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus* in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 755-759, 1994.

SIES, H. Strategies of antioxidant defenses. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-9, 1993.

SIGNORINI, R.; SIGNORINI, R. Atividade física e radicais livres. In: GOHAYEB, N.; BARROS, T. (ed). **O exercício: preparação fisiológica, avaliação médica, aspectos gerais e preventivos**. São Paulo: Atheneu, 1995.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach. **Quim. Nova**. V. 21, n. 5, p. 557-9, 1998.

STOCKER, R.; FREI, B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha tocopherol. In: SIES, H. (ed) **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**, London: Academic Press, 1991. p. 213-431.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium – Compêndio de Fitoterapia**. 2^a. ed. Herbarium Lab. Bot. LTDA. Curitiba, PR. P. 99-101, 1995.

TIETZE, F. Enzyme method for quantitative determination of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.**, v. 27, p. 502-22, 1969.

TORRE, P. D.; HARMS, D. *Genera Siphonogrammarum Eugleniarum conscripta*, (Weinheim), 1958.

UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica**. Lima, Peru: Fondo Editorial, 1994. p. 255-267.

VEIT, M.; GEIGER, H.; CZYGAN, F.; MARKHAM, K. R. Malonylated flavone 5-o-glucosides in the barren sprouts of *Equisetum arvense*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2555-2560, 1990.

VEIT, M.; STRACK, D.; CZYGAN, F.; WRAY, V.; WITTE, L. Di-O-caffeoyl-meso-tartaric acid in the barren sprouts of *Equisetum arvense*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 527-529, 1991.

VEIT, M.; WEIDNER, C.; STRACK, D.; WRAY, V.; WITTE, L.; CZYGAN, F. The distribution of caffeic acid conjugates in the Equisetaceae and some ferns. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3483-3485, 1992.

VEIT, M.; GEIGER, H.; WRAY, V.; ABOU-MANDOUR, A.; ROZDZINSKI, W.; WITTE, L.; STRACK, D.; CZYGAN, F. Equisetumpyrone, a styrylpyrone glucoside in gametophytes from *Equisetum arvense*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 4, p. 1029-1032, 1993.

VEIT, M.; BECKERT, C.; HÖHNE, C.; BAYER, K.; GEIGER, H. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 881-891, 1994.

VEIT, M.; GEIGER, H.; KAST, C.; BECKERT, C.; HORN, C.; MARKHAM, K. R.; WONG, H.; CZYGAN, F.-C. Styrylpyrone glucosides from *Equisetum*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 915-917, 1995.

WILHELM-FILHO, D.; GONZALEZ-FLECHA, B.; BOVERIS, A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2879-82, 1994.

WILHELM-FILHO, D.; MARCON, J. L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: ALMEIDA-VAL, V. A.; RANDAL, D. J. **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**, Manaus: INPA, 1996. p. 299-312.

YESILADA, E.; TSUCHIYA, K.; TAKAISHI, Y.; KAWAZDE, K. Isolation and characterization of free radical scavenging flavonoid glycosides from the flowers of *Spatium junceum* by activity-guided fractionation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 471-478, 2000.

YOKOZAWA, E.; DONG, E.; LIU, Z. W.; SHIMIZU, M. Antioxidative activity of flavones and flavonols in vitro. **Phytochemistry Research**, v. 11, p. 446-499, 1997.

YUNES, R. A.; PEDROZA, R. C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZHANG, A.; CHANG, Q.; ZHU, M.; HUANG, Y.; HO, W. K. K.; CHEN, Z. Y.
Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. **J. Nutri. Biochem.**, v. 12, p. 144-152, 2001.

ZGÓRKA, G.; GLOWNIAK, K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. **J. Pharm. Biochem. Ann.**, v. 26, p. 79-87, 2001.